



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**DETEKSI GEN VIRULEN DAN PLASMID PADA *Vibrio*
parahaemolyticus DAN *Escherichia coli* O157 DARI BEBERAPA
MAKANAN LAUT SERTA PENGUJIAN RESISTENSI ANTIBIOTIKA**

TESIS



**RIA AFRIANTI
0821213004**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
2010**

Deteksi Gen Virulen dan Plasmid pada *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* O157 dari Beberapa Makanan Laut serta Pengujian Resistensi Antibiotika

**Oleh: Ria Afrianti
(Di bawah bimbingan Husni Mukhtar dan Marlina)**

RINGKASAN

V. parahaemolyticus merupakan bakteri laut yang beberapa strainnya dapat mengakibatkan gastroenteritis pada manusia akibat konsumsi *seafood* yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Manifestasi klinis yang utama akibat infeksi *V. parahaemolyticus* adalah gastroenteritis, dimana gejala utama pada diare yang disebabkan oleh *V. parahaemolyticus* meliputi kram abdomen, mual dan muntah. Kebanyakan strain *V. parahaemolyticus* klinis menghasilkan faktor virulen utama yaitu *thermostable direct hemolysin* (TDH) dan *TDH-related hemolysin* (TRH), yang produksinya dikodekan oleh gen *tdh* dan *trh*. Oleh sebab itu, gen-gen ini disebut sebagai gen-gen virulen penting pada bakteri *V. parahaemolyticus*.

Escherichia coli enterohemoragik (EHEC) adalah salah satu bakteri usus patogen yang dapat menyebabkan *hemoragik colitis* (HC), *hemolitik uremic syndrome* (HUS). *E. coli* enterohemoragik O157 menyebabkan diare berdarah. Mengingat masih rendahnya tingkat sanitasi lingkungan di negara berkembang, Penyakit diare yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* patogen menjadi masalah penting apabila terjadi wabah. Makanan yang terkontaminasi bakteri *E. coli* khususnya EHEC menyebabkan diare yang disertai pendarahan, karena toksin SLT (*shiga like toxin*) yang dihasilkannya yaitu *Stx1* atau *Stx2* atau bahkan keduanya sekaligus. Titik asal dari bakteri ini adalah ruminansia seperti domba,

kambing sapi, babi yang dapat mengkontaminasi makanan atau bahan lainnya. Sumber lain dari strain ini adalah pembuangan limbah atau kotoran yang sembarangan. Pencemaran lingkungan melalui sumber-sumber ini menandakan resiko bagi kesehatan manusia karena infeksi melalui konsumsi air yang terkontaminasi. Lingkungan pesisir adalah wadah dari air limbah dan STEC kemungkinan ada di daerah pesisir yang sangat terbuka. Infeksi ini dapat dicegah dengan mengidentifikasi sumbernya antara lain makanan yang terkontaminasi.

Selama ini ada beberapa metode konvensional yang digunakan untuk menentukan adanya *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 dari sampel antara lain metode biakan, uji biokimiawi, dan uji serologis. Cara-cara tersebut mempunyai kelemahan dan keterbatasan, selain memerlukan waktu lama juga tidak spesifik. Maka metoda yang digunakan pada penelitian ini adalah metoda *Polimerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan suatu tehnik dengan tingkat sensitifitas yang tinggi serta mampu mengamplifikasi DNA dalam jumlah pikogram dan dapat dilakukan tanpa harus membebaskan DNA dari komponen sel lain.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 pada udang putih (*Penaeus merguensis*), udang kelong (*Penaeus indicus*), cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) dan kepiting (*Scylla serrata*) yang diambil pada daerah tepi laut laut Jalan Samudra Kota Padang. Dari total 13 sampel yang dilakukan pengisolasian bakteri yaitu 3 sampel udang kelong, 3 sampel udang putih, 4 sampel cumi-cumi dan 3 sampel kepiting, maka *V. parahaemolyticus* didapatkan 115 isolat yang diduga *V. parahaemolyticus* yang memperlihatkan adanya koloni berwarna ungu pada media CHROMAgarTM *Vibrio* yang merupakan media spesifik untuk pertumbuhan *V. parahaemolyticus* yang kemudian

dilanjutkan konfirmasi keberadaan *V. parahaemolyticus* dengan mendeteksi gen *toxR* menggunakan metoda PCR, hasil memperlihatkan bahwa terdapat 86 isolat positif (74,78%) terdeteksi mengandung gen *toxR*. Dari 86 isolat positif *toxR* selanjutnya dilakukan deteksi gen *tdh* dan *trh*, hasil yang didapatkan 8 isolat positif (9,30%) yang mengandung gen *tdh* dan 5 isolat positif (5,81%) yang mengandung *trh*. Hasil uji resistensi 86 isolat *V. parahaemolyticus* terhadap 6 jenis antibiotika menunjukkan 67 isolat (77,90%) resisten terhadap ampisilin, 21 isolat (24,44%) resisten terhadap kloramfenikol, 38 isolat (44,18%) resisten terhadap eritromisin, 27 isolat (31,39%) resisten terhadap gentamisin, 80 isolat (93,02%) resisten terhadap sulfametoksazol, 25 isolat (29,06%) resisten terhadap tetrasiklin

Sedangkan pada bakteri *E. coli* O157 didapatkan 81 isolat yang memperlihatkan koloni warna ungu pada media CHROMagar™O157 yang merupakan media spesifik untuk pertumbuhan *E.coli* O157 yang kemudian dilanjutkan dengan mendeteksi gen *stx1* dan *stx2* bakteri *E. coli* O157 dan hasil yang didapatkan bahwa terdapat 19 isolat positif (23,45%) memiliki gen *stx1*; 26 isolat positif (32,09%) yang mengandung gen *stx2*, 5 isolat positif (6,17%) yang mengandung gen *stx1* dan *stx2*, dan 41 isolat (50,61%) negatif gen *stx1* dan *stx2*. Hasil uji resistensi 40 isolat *E. coli* O157 terhadap 6 jenis antibiotika menunjukkan 31 isolat (77,5%) resisten terhadap ampisilin, 22 isolat (55%) resisten terhadap kloramfenikol, 10 isolat (25%) resisten terhadap eritromisin, 24 isolat (60%) resisten terhadap gentamisin, 30 isolat (75%) resisten terhadap sulfametoksazol, 15 isolat (37,5%) resisten terhadap tetrasiklin.


Dari 86 isolat *V. parahaemolyticus* yang resisten dilanjutkan dengan plasmid, didapatkan 32 pola resistensi antibiotika dan dideteksi keberadaan plasmid pada 19 isolat yang memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp. 40 isolat *E. coli* O157 dilakukan isolasi plasmid, didapatkan 24 pola resistensi antibiotikaa dan dideteksi keberadaan plasmid pada 12 isolat memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp.



DENGAN NAMA ALLAH YANG MAHA PENGASIH LAGI MAHA PENYAYANG

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”

(Q.s Al Mujaadilah 58: 11)



Kupersembahkan secercah harapan sebersit asa
Kepangkuan Ayah dan Ibu tercinta, atas limpahan
Kasih sayangmu yang telah diberikan dan cucuran
Keringat, do'a dan harapanmu mengantarku meraih
Keberhasilan ini yang selama ini kurindukan dan impikan
Semua kakak dan adikku tersayang, pengorbananmu, perhatian
dan kasih sayang mendorong semangatku tuk s'lalu tegar
dan yakin dalam menghadapi semua ini,
Semoga Allah SWT senantiasa menyayangi
dan melindungi kita semua. Amin

PERNYATAAN KEASLIAAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang saya tulis dengan judul **Deteksi Gen Virulen dan Plasmid pada *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* O157 dari Beberapa Makanan Laut serta Pengujian Resistensi Antibiotika** adalah hasil kerja/karya sendiri, bukan merupakan jiplakan dari hasil karya orang lain kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Juli 2010

Yang membuat pernyataan,

Ria Afrianti



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 5 April 1981 di Muara Panas Solok, sebagai anak kedua dari enam bersaudara, dari ayah Asril dan ibu Eni Saswita. Penulis menamatkan SD pada tahun 1993, SMP tahun 1996 dan SMA tahun 1999. Penulis memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang tahun 2003 dan meraih gelar Profesi Apoteker pada tahun 2004. Tahun 2005 sampai tahun 2006 penulis bekerja sebagai Apoteker di Rumah Sakit Umum Indah Bagan Batu Riau, Sejak tahun 2006 sampai sekarang penulis bekerja sebagai staf pengajar di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang. Pada tahun 2008 memperoleh kesempatan meneruskan pendidikan pada program Pascasarjana Universitas Andalas Padang dengan biaya BPPS.



KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala Rahmat dan Hidayah-Nya hingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun tesis yang berjudul **Deteksi Gen Virulen dan Plasmid pada *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli* O157 dari Beberapa Makanan Laut serta Pengujian Resistensi Antibiotika.**

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya Bapak DR. H. M. Husni Mukhtar MS, DEA, Apt dan Ibu DR. Hj. Marlina, MS, Apt selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan, saran dan bimbingannya selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada rekan-rekan seangkatan yang telah memberikan semangat dan dorongan, serta para analis Laboratorium Farmasi yang telah membantu dalam melakukan penelitian ini.

Akhirnya penulis berharap semoga hasil penelitian yang telah dituangkan dalam tesis ini akan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Padang, Juli 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6
2.1.1. Taksonomi <i>V. parahaemolyticus</i>	6
2.1.2. Epidemiologi <i>V. parahaemolyticus</i>	6
2.1.3. Patogenitas <i>V. parahaemolyticus</i>	9
2.2. <i>Escherichia coli</i> O157	9
2.2.1. Taksonomi <i>V. parahaemolyticus</i>	12
2.2.2. Epidemiologi <i>E. coli</i> O157	12
2.2.3. Patogenitas <i>E. coli</i> O157	14
2.3. Udang Putih (<i>Penaeus merguensis</i>)	15
2.4. Udang Kelong (<i>Penaeus indicus</i>)	17
2.5. Cumi-cumi (<i>Loligo vulgaris</i>)	17

2.6. Kepiting (<i>Scylla serrata</i>)	18
2.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)	20
2.7.1. Prinsip Dasar PCR.....	22
2.7.2. DNA Polimerase yang digunakan dalam PCR.....	24
2.7.3. Taq DNA Polimerase.....	24
2.7.4. Pengembangan Teknik PCR.....	27
2.8. Elektroforesis	28
2.9. Antibiotika	29
2.9.1. Klasifikasi Antibiotika.....	30
2.9.2. Resistensi Antibiotika.....	33
2.9.3. Mekanisme Resistensi Antibiotika	37
3.0. Plasmid	41
3.0.1. Biosintesis dan Isolasi	47

III. BAHAN DAN METODA PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	49
3.2. Alat dan Bahan.....	49
3.3. Metoda Penelitian.....	50
3.3.1. Sterilisasi Alat.....	50
3.3.2 Pembuatan Media.....	51
3.3.3 Pengambilan Sampel	52
3.3.4. Isolasi Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157.....	53
3.3.5. Deteksi Gen Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157	54
3.3.6. Uji Resistensi Biakan Murni <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157 terhadap Berapa Antibiotika.....	57
3.3.7. Deteksi Plasmid Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157	57

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil 59

4.2. Pembahasan 61

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan 73

5.2. Saran 73

DAFTAR PUSTAKA 74

LAMPIRAN 84



DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
I. Daftar komponen dan campuran pereaksi yang digunakan untuk gen <i>toxR</i>	55
II. Daftar komponen dan campuran pereaksi yang digunakan untuk gen <i>toxR</i> , <i>tdh</i> , <i>trh</i> , <i>stx1</i> , dan <i>stx2</i>	55
III. Program kerja mesin PCR untuk deteksi gen <i>toxR</i>	55
IV. Program mesin PCR untuk gen <i>tdh</i> dan <i>trh</i>	55
V. Program mesin PCR untuk gen <i>stx1</i> dan <i>stx2</i>	56
VI. <i>Primer</i> spesifik untuk deteksi gen <i>toxR</i> , <i>tdh</i> , <i>trh</i> , <i>stx1</i> , dan <i>stx2</i>	56
VII. Standar diameter daerah hambat antibiotika	57
VIII. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid isolat <i>V. parahaemolyticus</i>	90
IX. Rekapitulasi hasil deteksi gen <i>toxR</i> , <i>tdh</i> , <i>trh</i> isolat <i>V. parahaemolyticus</i>	96
X. Hasil uji resistensi dan sensitivitas isolat <i>V. parahaemolyticus</i> terhadap beberapa antibiotika	96
XI. Rekapitulasi isolat <i>V. parahaemolyticus</i> yang resisten pada beberapa jenis antibiotika	96
XII. Data hasil uji resistensi <i>V. parahaemolyticus</i> pada sampel makanan laut terhadap beberapa antibiotika	98
XIII. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid pada isolat <i>E.coli</i> O157	103
XIV. Rekapitulasi hasil deteksi gen <i>stx1</i> dan <i>stx2</i> pada isolat <i>E.coli</i> O157	108
XV. Hasil uji resistensi dan sensitivitas isolat <i>E. coli</i> O157 terhadap beberapa antibiotika	108
XVI. Rekapitulasi isolat <i>E.coli</i> O157 yang resisten pada beberapa jenis antibiotika ...	108
XVII. Data hasil uji resistensi strain <i>E. coli</i> O157 pada sampel makanan laut terhadap beberapa antibiotika	110

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Skema isolasi <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	82
2. Skema isolasi <i>Escherichia coli</i> O157	83
3. Skema pembuatan <i>template</i> DNA bakteri dengan metode <i>Boil Cell Extraction</i>	84
4. Skema pendeteksian gen <i>V. parahaemolyticus</i> (<i>toxR</i> , <i>tdh</i> , dan <i>trh</i>) dan gen <i>E.coli</i> O157 (<i>stx1</i> , <i>stx2</i>)	85
5. Skema uji resistensi <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157 terhadap beberapa antibiotika	86
6. Skema kerja deteksi plasmid <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157	87
7. Foto sampel makanan laut	88
8. Koloni ungu <i>V. parahaemolyticus</i>	89
9. Koloni ungu <i>E. coli</i> O157	89
10. Foto gel agarose 1% gen <i>toxR</i> hasil elektroforesa	95
11. Foto gel agarose 1% gen <i>tdh</i> hasil elektroforesa	95
12. Foto gel agarose 1% gen <i>trh</i> hasil elektroforesa	95
13. Foto hasil elektroforesa gel plasmid <i>V. parahaemolyticus</i>	97
14. Foto gel agarose 1% gen <i>stx1</i> hasil elektroforesa	107
15. Foto gel agarose 1% gen <i>stx2</i> hasil elektroforesa	107
16. Foto hasil elektroforesa gel plasmid <i>E. coli</i> O157	109
17. Contoh foto diameter daerah hambat pada uji resistensi terhadap beberapa antibiotika	112

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema kerja	82
2. Foto Sampel.....	88
3. Foto hasil isolasi bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> dan <i>E. coli</i> O157	89
4. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid isolat <i>V. parahaemolyticus</i> ..	90
5. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid pada isolat <i>E.coli</i> O157	103
6. Contoh foto diameter daerah hambat pada uji resistensi terhadap beberapa antibiotika	112
7. Komposisi media dan pereaksi.....	113

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Vibrio parahaemolyticus termasuk bakteri halofilik gram negatif, yang biasanya berasosiasi dengan organisme laut seperti plankton, zooplankton, ikan, kerang laut atau hidup secara bebas dalam air laut (Kaysner, *et al.*, 2001; McCarter, 1999). Infeksi bakteri ini dapat menyebabkan penyakit gastroenteritis dengan gejala diare, mual, muntah dan pusing akibat konsumsi makanan hasil laut yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut (Nishibuchi *et al.*, 1995; Joseph *et al.*, 1982). Selain itu juga sering ditemukan pada air laut daerah pesisir pantai (Garcia *et al.*, 2004). Makanan yang termasuk dalam kategori makanan laut termasuk ikan, kerang dan crustacea, seperti dijelaskan pada Survey Gizi Nasional tahun 1997 (Russell *et al.*, 1999) menunjukkan bahwa konsumsi makanan laut Selandia Baru adalah terutama ikan (83%), molusca (11%), dan crustacea (6%), merupakan makanan laut mentah yang secara alami terkontaminasi *V. parahaemolyticus* dan *V. vulnificus* karena sifat halofilik yang dapat menyebabkan infeksi (Desmarchelier, 2003).

Penyakit yang disebabkan bakteri *V. parahaemolyticus* terjadi di seluruh dunia dengan kejadian tertinggi pada wilayah dimana orang gemar memakan makanan laut mentah atau tidak matang seperti negara Jepang, Taiwan dan Korea termasuk juga negara beriklim tropis di Asia lainnya (Doyle, and Padhye, 1989). Oleh karena itu, tinggi atau rendahnya tingkat kontaminasi *V. parahaemolyticus* dijadikan sebagai parameter kualitas ekspor bahan makanan laut di beberapa negara termasuk Indonesia.

Faktor virulen yang menentukan patogenitas *V. parahaemolyticus* adalah gen pengkode produksi toksin hemolisin (gen *tdh* dan *trh* atau keduanya). Penelitian mengenai adanya gen virulen untuk mengkonfirmasi adanya bakteri *V. parahaemolyticus* pada makanan laut telah dilakukan dan dipublikasi di Jepang, Taiwan, Mexico (Hara-Kudo, *et al*, 2003; Hernandes, *et al*, 2003; Hayaschi, *et al*, 2006). Di Indonesia, seperti halnya yang telah dilakukan isolasi *V. parahaemolyticus* dari air laut oleh Marlina (2008), *Corbicula molitkiana* dari danau singkarak (Marlina, *et al.*, 2007) yang berhasil diisolasi adanya *V. parahaemolyticus*.

Shiga-like toxin producing Escherichia coli (STEC) diketahui penyebab penyakit serius pada manusia dan keprihatinan kesehatan masyarakat yang utama (Paton dan Paton 1998a). Infeksi akibat STEC dapat menyebabkan diare *Haemorrhagic Colitis* (HC), *Haemolytic Uraemic Syndrome* (HUS).

Escherichia coli O157:H7 adalah bakteri patogen yang pertama kali diidentifikasi tahun 1982, yang dikenal *E. coli* enterohemoragik (EHEC) dan dikaitkan dengan dua wabah yang terkait dengan konsumsi hamburger yang terkontaminasi di Amerika Serikat (Riley *et al.* 1983) wabah yang terkait dengan STEC didokumentasikan dengan baik di seluruh dunia. Infeksi manusia dilaporkan dari atas 30 negara di enam benua (Mead dan Griffin 1998) terutama dari makan mentah atau kurang matang, makanan terkontaminasi. Faktor virulensi utama STEC adalah produksi satu atau lebih *Shiga like toxin* (STX) (Jothikumar and Griffiths, 2002; Nakasone, *et.al*, 2005).

Habitat STEC adalah ruminansia seperti domba, kambing, dan khususnya, bovines (Zschock *et al.* 2000; Hancock *et al.* 2001). Hewan lain seperti babi dan

anjing juga menjadi sumber strain STEC (Beutin *et al.* 1993; Bouvet *et al.* 2001). Sumber lain dari strain ini adalah pembuangan limbah atau kotoran yang sembarangan. Pencemaran lingkungan melalui sumber-sumber ini menandakan resiko bagi kesehatan manusia karena infeksi melalui konsumsi dan penggunaan air yang terkontaminasi. Lingkungan pesisir adalah wadah dari air limbah dan STEC kemungkinan ada di daerah pesisir yang sangat terbuka. Infeksi ini dapat dicegah dengan mengidentifikasi sumbernya antara lain makanan yang terkontaminasi. Di Perancis, pernah dilaporkan adanya terdeteksi STX dalam 40 dari 144 (27,8%) sampel enrichments dari remis, tiram atau kerang (Gourmelon *et al.*, 2006). Pada penelitian ini akan dilakukan terhadap makanan laut yaitu udang putih (*Penaeus merguensis*), udang kelong (*Penaeus indicus*), cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) dan kepiting (*Scylla serrata*) yang di ambil di daerah tepi laut pantai Padang yang kemungkinan terkontaminasi dari *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157.

V. parahaemolyticus dan *E. coli* O157 dapat diidentifikasi dengan menggunakan metoda PCR (Sujeewa, *et al.*, 2009; Sudrajat, dkk, 2000; Meng, *et al.*, 1996). Prinsip kerja dari PCR adalah mengamplifikasi molekul DNA yang diinginkan secara *in vitro* dengan menggunakan *primer* yang spesifik. Metoda sangat spesifik, sensitif, cepat dan dapat mengidentifikasi sampel dalam jumlah yang sangat kecil sehingga banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, virus dan jamur (Coyne, *et al.*, 2001). Metoda ini dapat digunakan untuk mendeteksi gen spesifik yaitu gen *toxR* (Toxin Regulator), *tdh* (thermostable direct hemolysin), *trh* (thermostable direct hemolysin related hemolysin) yang dimiliki oleh *V. parahaemolyticus* dan juga gen *stx1* dan *stx2* yang dimiliki oleh

E. coli O157 yang merupakan faktor virulen yang penting untuk mengetahui patogenitas dari bakteri tersebut. (Hara-Kudo, *et al*, 2003).

Bakteri yang telah diisolasi dan terdeteksi adanya gen virulen pada bakteri *V.parahaemolyticus* dan *E.coli* O157 dilanjutkan dengan uji resistensinya terhadap beberapa antibiotika, karena bakteri pada lingkungan alaminya menunjukkan resistensi terhadap beberapa antibiotika (Desselberger, 1998). Bakteri dapat bersifat resisten terhadap antibiotika karena adanya mutasi kromosom ataupun karena pertukaran material genetik melalui transformasi, transduksi dan konjugasi melalui plasmid (Neu, 1992). Plasmid terlibat dalam transfer dan penyebaran gen resisten untuk satu atau lebih antibiotika. Gen-gen tertentu yang membawa sifat resistensi pada obat dapat berpindah dari populasi bakteri yang resisten ke bakteri yang sensitif. Dengan cara inilah sebagian besar dari sifat resisten obat tersebar dalam populasi bakteri sehingga menimbulkan *multi drug resistance*. Selain daripada itu bakteri *E.coli* telah menunjukan multiresistensi (Neu, 1992). Sifat resistensi ini dibawa oleh faktor R pada plasmid, untuk itu perlu dilakukan isolasi plasmid dan pendeteksian keberadaan plasmid sehingga dapat diketahui hubungan antara profil plasmid masing-masing isolat dengan pola antibiotika.

Berdasarkan hal diatas, maka dilakukan deteksi gen virulen bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 pada beberapa makanan laut dengan menggunakan metoda PCR dan uji resistensi antibiotika serta mendeteksi adanya plasmid yang sebelumnya dilakukan isolasi plasmid.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan penelusuran literatur, belum dilaporkan masalah tentang makanan laut yaitu udang putih (*Penaeus merguensis*), udang kelong (*Penaeus indicus*), cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) dan kepiting (*Scylla serrata*) di daerah tepi laut Jl. Samudera kota Padang yang terkontaminasi oleh bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157, untuk itu dilakukan isolasi bakteri dan deteksi gen virulen pada kedua bakteri tersebut sehingga dapat diketahui apakah bakteri tersebut kontaminan membawa gen virulen pada makanan laut, bagaimana pola resistensi antibiotika dari isolat dan apakah isolat yang resisten terdeteksi adanya plasmid.

1.3. Tujuan Penelitian

- Mendeteksi adanya gen virulen *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 pada udang putih (*Penaeus merguensis*), udang kelong (*Penaeus indicus*), cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) dan kepiting (*Scylla serrata*) menggunakan metoda *Polimerase Chain Reaction* (PCR).
- Mendeteksi keberadaan plasmidnya dan menguji resistensi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 terhadap beberapa antibiotika.

1.4. Manfaat Penelitian

- Dapat melengkapi sebagian kecil dari database bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 yang berpotensi patogen dan menjadi perhatian masalah kesehatan dalam sanitasi masyarakat serta dapat memberikan informasi tentang penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri tersebut yang dapat mempengaruhi kesehatan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus merupakan anggota dari genus *Vibrio* yang memiliki ciri-ciri bakteri gram negatif, bersifat anaerob fakultatif, sel berupa batang, berbentuk koma, dapat bergerak menggunakan flagella polar tunggal, dapat bersimbiosis dengan ikan, udang, dan kerang. Pertumbuhan terbaik pada kadar garam 2-3% NaCl (Doyle, and Padhye, 1989).

2.1.1. Taksonomi *V. parahaemolyticus*

Taksonomi untuk bakteri *V. parahaemolyticus* sebagai berikut (Holt, 1994) :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Thallophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Vibrionaceae/ Spirillaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

2.1.2. Epidemiologi *V. parahaemolyticus*

Pada tahun 1950, seorang ilmuwan yang bernama Fujino untuk pertama kalinya melaporkan bahwa bakteri *V. parahaemolyticus* menjadi penyebab keracunan akibat mengkonsumsi makanan laut yang terjadi di Osaka, Jepang. *V. parahaemolyticus* diisolasi dari ikan sardin yang dikonsumsi oleh pasien yang ternyata juga terdapat pada sampel usapan rektal dari pasien. Sejak saat itu bakteri

V. parahaemolyticus sering dilaporkan menjadi penyebab keracunan akibat mengkonsumsi makanan laut di seluruh negara di dunia. Di Amerika Serikat juga pernah dilaporkan gastroenteritis yang disebabkan oleh *V. parahaemolyticus* karena konsumsi kerang-kerangan dan crustacea akibat kontaminasi oleh bakteri ini (Daniels, *et al* 2001). Di Jepang, berdasarkan pengamatan penyakit yang menyerang manusia dipengaruhi oleh musim dan biasanya terjadi antara bulan juni dan oktober. Selama periode musim panas *V. parahaemolyticus* dapat diisolasi dari tinja seseorang yang diduga terinfeksi *V. parahaemolyticus* (Doyle, and Padhye, 1989; DePaola, *et al*, 2003)

Infeksi oleh *V. parahaemolyticus* dapat terjadi apabila mengkonsumsi makanan laut yang terkontaminasi dan tidak dimasak secara sempurna. Bakteri ini sangat banyak terdapat pada makanan yang berasal dari laut seperti udang, kerang, dan ikan yang biasa dikonsumsi oleh manusia. *V. parahaemolyticus* dapat diperoleh dari Perairan laut misalnya muara laut, ikan, kerang-kerangan dan crustacean (Kim, *et al*.1999). Frekuensi isolasi dan konsentrasi bakteri ini dapat diperoleh dalam jumlah besar selama musim panas daripada musim dingin dan jarang ditemukan pada suhu dibawah 13-15°C dan tidak ditemukan lagi pada suhu dibawah 10°C. Daftar kontaminasi *V. parahaemolyticus* pada beberapa makanan laut berbeda, konsentrasinya pada ikan segar $\leq 10^4$ /g, dan setara pada daerah perairan pesisir, di restoran sebelum di masak meningkat 1 log₁₀/g, pada udang jumlah *V. parahaemolyticus* yang ada dipasaran range <1 hingga 100/g, dan pernah dilaporkan pada kerang-kerangan konsentrasinya ≤ 1100 *V. parahaemolyticus*. Di Jepang, pada musim panas jumlah *V. parahaemolyticus* pada range 10³ hingga 10⁴g. Daerah epidemi penyakit diare yang disebabkan oleh

V. parahaemolyticus ini sangat luas meliputi Benua Asia, Benua Amerika, dan Benua Afrika dan Eropa. Khususnya pada negara-negara yang tingkat konsumsi terhadap makanan laut sangat tinggi seperti Jepang, Kanada, Taiwan, Korea, dan termasuk juga Indonesia (Doyle and Padhye, 1989).

Berdasarkan kemampuannya menghasilkan hemolisin bakteri *V. parahaemolyticus* dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu: *V. parahaemolyticus* Kanagawa + (positif) yaitu jenis *V. parahaemolyticus* yang dapat memproduksi hemolisin dan grup Kanagawa – (negatif) yang tidak dapat memproduksi hemolisin. Hampir semua *V. parahaemolyticus* hasil isolasi dari sampel klinis adalah grup Kanagawa + sedangkan hanya 1% dari sampel lingkungan yang termasuk ke dalam Kanagawa –. *V. parahaemolyticus* grup Kanagawa – dianggap tidak berbahaya karena tidak menghasilkan toksin yang berupa hemolisin yang dapat menyebabkan peningkatan sekresi cairan intestinal (Hart, *et al*, 2009; Osawa *et al*, 1996)

Berdasarkan struktur antigennya bakteri *V. parahaemolyticus* dapat dibagi menjadi beberapa kelompok. *V. parahaemolyticus* memiliki antigen O dan antigen K. Sampai saat ini telah diketahui sebanyak 13 macam antigen O dan 71 macam antigen K. Selama tahun 1979 sampai 1995 di Amerika Serikat tercatat grup O4:K12 adalah yang paling banyak menginfeksi manusia. Pada tahun 1996, grup O3:K6 mewabah di India dan selanjutnya dengan cepat menyebar di seluruh Negara di Benua Asia. Grup O3:K6 mewabah secara besar-besaran di Amerika Serikat pada tahun 1998. Baru-baru ini pada Bulan Juli dan Agustus 2005 grup O3:K6 mewabah di Eropa khususnya di Negara Spanyol dan Perancis. Infeksi

oleh *V. parahaemolyticus* ini terjadi karena mengkonsumsi makanan laut (Doyle and Padhye, 1989; Matsumoto *et al.*, 2000).

2.1.3. Patogenitas *V. parahaemolyticus* (Sujeewa, *et al.*, 2009)

Sumber *V. parahaemolyticus* dan aktivitas hemolitiknya dilaporkan pertama kali tahun 1968 dengan tes kanagawa. Berdasarkan pemeriksaan kanagawa + dan – sebagai agen hemolitik yang menunjukkan faktor virulen penyebab penyakit. Ada empat konstituen hemolytic pada *V. parahaemolyticus* yaitu Thermostable Direct Hemolysin, Thermolabile Hemolysin, phospholipase A dan lysophospholipase.

Bakteri dapat menyebabkan penyakit gastroenteritis atau diare yang dapat disertai dengan demam, sakit kepala, mual, dan kram perut. *V. parahaemolyticus* memiliki gen yang spesifik dan sekaligus berperan dalam pengaturan produksi toksin yaitu gen *toxR*. Gen ini pertamakali ditemukan pada bakteri *Vibrio cholerae* tetapi kemudian ditemukan juga pada bakteri *V. parahaemolyticus*. Gen *Vp-toxR* akan mengaktifkan gen-gen lainnya untuk menghasilkan produksi toksin yang berupa hemolisin seperti *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH), *Thermostable Direct Hemolysin-Related Hemolysin* (TRH), (TLH). TDH dan TRH adalah yang bertanggung jawab terhadap fenomena Kanagawa. Kedua toksin ini diketahui dapat meningkatkan sekresi cairan intestinal.

2.2. *Escherichia coli* O157

E. coli adalah salah satu jenis bakteri yang secara normal hidup dalam saluran pencernaan baik manusia maupun hewan yang sehat. Nama bakteri ini

diambil dari nama seorang bacteriologist yang berasal dari Germani yaitu Theodor Von Escherich, yang berhasil melakukan isolasi bakteri ini pertamakali pada tahun 1885. Dr. Escherich juga berhasil membuktikan bahwa diare dan gastroenteritis yang terjadi pada infant adalah disebabkan oleh bakteri *E. coli*. Namun sejak muncul outbreak diare berdarah yang pertamakali disebabkan oleh *E. coli* O157 pada tahun 1982, maka sejak itulah hewan ruminansia yang sehat terutama sapi diketahui dalam saluran pencernaannya merupakan reservoir bagi *E. coli* O157. (Doyle and Padhye. 1989; Fernandez, 2008).

Sebagian kecil strain *E. coli* bersifat patogen yang sangat penting dalam kesehatan dan menyebabkan berbagai penyakit diare pada manusia, yaitu dapat diklasifikasikan menjadi 5 tipe, yaitu (Doyle and Padhye. 1989; Fernandez, 2008; Nataro *et al*, 1998):

a. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

Enteroaggregative *E. coli* hanya ditemukan pada manusia yang merupakan penyebab terjadinya diare berair. EAEC ini menghasilkan enterotoksin tahan panas (ST). Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatan pada sel manusia.

b. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

ETEC merupakan penyebab diare pada bayi dan manusia dewasa. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. ETEC menghasilkan eksotoksin yang tidak tahan panas (LT) dan eksotoksin tahan panas (ST).

c. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan *shigelosis*. Penyakit ini sering terjadi pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang berkunjung ke negara tersebut. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus. EIEC ini tidak menghasilkan toksin.

d. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

EPEC merupakan penyebab diare pada bayi dan manusia dewasa. Diare tersebut disebabkan karena sel mukosa usus kehilangan kemampuan absorpsinya. Infeksi akibat EPEC terjadi melalui mekanisme "*attaching-effacing*" yang terdiri dari 3 tahap. Tahap pertama adalah perlekatan bakteri ke sel mukosa hospes. Pada tahap kedua, perlekatan tersebut menyebabkan keluarnya ion Ca^{2+} dari tempat penyimpanannya sehingga terjadi peningkatan jumlah ion Ca^{2+} intrasel. Kemudian terjadi pembentukan aktin disekitar daerah perlekatan bakteri dengan sel mukosa pada tahap ketiga. Akibatnya terjadi perubahan struktur sebagian mikrofil dan penghancuran sebagian mikrofil yang lain sehingga kemampuan sel-sel mukosa usus untuk menyerap air berkurang dan menyebabkan diare pada hospes.

e. Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)

Infeksi EHEC dapat terjadi pada manusia dan hewan. Kelompok dari bakteri ini adalah *E. coli* O157:H7 yang menyebabkan diare berdarah dan *haemolytic uraemic syndrome* yang mengakibatkan gagal ginjal akut. Toksin yang dihasilkannya adalah *shiga-like toxin*.

Serotipe *E.coli* merupakan salah satu yang penting dalam mengklasifikasi spesies, yaitu berdasarkan perbedaan antigen yang terdapat pada bakteri *E. coli*. Pola pembagian serotype ini dikembangkan oleh Kauffmann pada tahun 1944 yaitu *E.coli* somatik O adalah antigen O yang merupakan polisakarida yang terdapat pada membran sel lipopolisakarida dan H adalah antigen H yang merupakan komponen dari flagella bakteri yang mempunyai 56 H antigen. Bentuk antigen O mempunyai lebih dari 170 serogroup, setiap serogroup mempunyai satu atau lebih serotype yang berdasarkan antigen H, misalnya: O126:H27 dan O157:H7 (Doyle and Padhye, 1989).

2.2.1. Taksonomi *Escherichia coli* (Salle A. J, 1961)

Taksonomi untuk *E. coli* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plant
Filum	: Thallophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

2.2.2. Epidemiologi *E. coli* O157

E. coli O157 telah tersebar diseluruh dunia tetapi sebagian besar wabah telah didokumentasikan di Kanada, Inggris dan Amerika Serikat. Penyakit ini dilaporkan 19 kasus adalah HC, 1 kasus HUS dan 4 kasus menyebabkan kematian

dan epidemiologi ini disebabkan karena kebiasaan masyarakatnya yang gemar mengonsumsi daging setengah matang dan makanan cepat saji (*fast food*). Hal ini bisa diatasi dengan memasak masakan secara sempurna. Angka kejadian infeksi *E. coli* O157 juga banyak terjadi di Jepang dengan kebiasaan masyarakatnya yang suka mengonsumsi makanan yang berasal dari laut seperti udang, kerang, dan ikan yang disajikan setengah matang bahkan tidak dimasak. Hal ini menyebabkan *E. coli* O157 yang mengkontaminasi makanan tersebut masih hidup, karena *E. coli* O157 dapat bertahan hidup pada suhu 50°C (Doyle and Padhye, 1989).

E. coli O157 adalah pertama kali dikenali sebagai *foodborne* patogen pada tahun 1982 dalam sebuah laporan dari hemorragis penyakit diare berdarah yang terkait dengan konsumsi hamburger yang tercemar. Ada tiga manifestasi penyakit yang disebabkan oleh infeksi *E. coli* O157 yaitu *haemorrhagic colitis* (HC), *haemolytic uraemic syndrome* (HUS), *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP) (Riley, *et al*, 1983).

Haemorrhagic colitis (HC) yang ditandai dengan gejala kram perut yang diikuti oleh diare berair dan menjadi diare berdarah, dengan atau tanpa demam. Masa inkubasi pada range 3-9 hari dengan rata-rata 4 hari dan lamanya penyakit umumnya range 2-9 hari dengan rata-rata 4 hari.

Haemolytic uraemic syndrome (HUS) pertama kali dijelaskan oleh Gasser pada tahun 1955, merupakan sindrom klinis yang ditandai oleh gagal ginjal progresif disertai anemia hemolitik mikroangiopati dan trombositopenia seperti *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP), terutama menyerang anak-anak. HUS adalah bagian dari *thrombotic microangiopathy* yaitu penyakit oklusi

pembuluh darah kecil yang ditandai adanya agregasi platelet intrarenal atau sistemik, trombositopenia dan kerusakan mekanis pada eritrosit.

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) pertama kali dijelaskan oleh Moschowitz pada tahun 1924, terjadinya agregasi platelet pada mikrovaskular sistemik sehingga mengakibatkan iskemia pada otak dan organ lainnya.

Pada tahun 1985, ditemukan hubungan antara HUS dengan infeksius usus oleh *Escherichia coli* yang menghasilkan verositoksin atau shiga toxins (Stx) (Karmali, 1985). Serotipe dari bakteri EHEC ini adalah *E. coli* O157 yang menghasilkan toksin yaitu *shiga-like toxin*. *Shiga-like toxin* merupakan toksin regulator yang mengkatalisa inaktivasi sub unit ribosom 60S dari sel sehingga menghambat translasi mRNA yang menyebabkan kematian sel. *Shiga-like toxin* memiliki banyak sifat yang mirip dengan toksin *Shiga* yang dihasilkan oleh beberapa strain *Shigella dysenteriae* (Koitabashi, *et al*, 2005).

2.2.3. Patogenitas *E. coli* O157

Sebagai bakteri yang bersifat patogen, *E. coli* O157 memiliki beberapa faktor virulen yang membantu bakteri menyerang induk semangnya yaitu saluran pencernaan manusia. Shiga like toxin (SLT) atau shiga toxin yaitu *Stx1* dan *Stx2* adalah salah satu faktor virulen dari *E. coli* O157 yang utama. Toksin yang dihasilkan oleh *E. coli* O157 dalam lumen usus manusia dapat masuk ke lapisan usus bagian lebih dalam, akibat adanya faktor virulen yang lain yaitu intimin. Faktor virulen intimin dapat menyebabkan munculnya attaching dan effacing lesions sehingga terjadi locus of enterocyte effacement (LEE). Bakteri EHEC menghasilkan faktor protein EspA dan EspB yang dapat membantu terjadinya

penempelan pada epitel usus, dengan dibantu adanya gene *eae* yang terdapat pada bakteri EHEC. Setelah bakteri EHEC berhasil menempel pada epitel usus dan menimbulkan lesi maka bakteri dan toxin yang telah dihasilkan dalam lumen usus dapat menembus ke bagian lapisan yang lebih dalam dan menembus lapisan endothel sehingga masuk kedalam aliran darah. Faktor virulen hemolysin (*hlyA*) dikode oleh adanya faktor plasmid yang terdapat di dalam bakteri EHEC. EHEC yang menempel pada sel epitel akhirnya menyebabkan terjadinya attaching dan effacing lesion yang diikuti dengan lepasnya microvilli serta terjadinya bentuk perlekatan “pedestal”. Kemudian Shiga toxin yang telah dihasilkan akan masuk ke bagian yang lebih dalam dan meninggalkan lumen sehingga menyebabkan efek sistemik.

2.3. Udang Putih (*Penaeus merguensis*) (Darmono, 1991)

Penaeus merguensis dikenal dengan nama daerah udang putih, udang pisang. Spesies ini hidup pada perairan laut dangkal sampai dalam dan banyak ditemukan di daerah yang beriklim tropis, lautan Atlantik, lautan Pasifik, dan lautan India merupakan daerah yang sangat disukai oleh udang ini untuk tumbuh, karena daerah tersebut merupakan daerah tropis dan suhu laut mencapai 20° C, dimana pada suhu tersebut *Penaeus merguensis* dapat tumbuh, bertelur dan berkembang biak dengan baik. Pertumbuhan hewan ini juga dipengaruhi oleh kadar garam air laut. Udang yang termasuk jenis ini biasanya dapat mencapai ukuran yang besar pada masa dewasanya. Dalam masa pertumbuhannya, *Penaeus merguensis* ini melewati beberapa macam kondisi dan lingkungan yang berbeda-beda demi keselamatan hidupnya. Pada setiap stadium pertumbuhannya, mereka

memerlukan lingkungan yang khusus agar tidak dimakan oleh makhluk lain misalnya ikan. Dalam keadaan alami, keselamatan hidupnya banyak tertantang, misalnya telurnya yang terombang ambing di laut dan hanya beberapa persen saja yang dapat menetas dan tumbuh menjadi dewasa. Untuk mempertahankan diri, udang putih ini mempunyai kebiasaan mengubur dirinya di bawah lumpur atau pasir pada dasar laut.

Tubuh *Penaeus merguensis* terdiri atas tiga bagian yaitu kepala yang tertutup carapaceae, lima ruas bagian perut yang masing-masing ruas mempunyai sepasang pleopod dan dua ruas terakhir terdiri dari bagian ruas perut dan ruas telson serta uropot. Tubuh agak melengkung, bila berjalan merayap di dasar air dengan menggunakan kakinya yang dapat juga digunakan untuk berenang. Mempunyai sepasang mata, sepasang antena, sepasang antenula pada bagian dalam dan luar, tiga buah maxiliped, lima pasang chele (periopod), lima pasang pleopod, sepasang telson dan uropot. Tubuh berwarna kuning muda keputih-putihan sehingga disebut udang pisang atau udang putih.

Taksonomi *Penaeus merguensis* adalah sebagai berikut :

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Malacostraca
Ordo	: Deapoda
Famili	: Panacida
Genus	: <i>Penaeus</i>
Spesies	: <i>Penaeus merguensis</i>

2.4. Udang Kelong (*Penaeus indicus*) (Darmono, 1991)

Udang Kelong merupakan salah satu komoditas ekspor yang besar hampir di seluruh dunia.

Taksonomi *P.indicus* adalah sebagai berikut :

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Malacostraca
Ordo	: Deapoda
Famili	: Panaeida
Genus	: <i>Penaeus</i>
Spesies	: <i>Penaeus indicus</i>

Udang kelong (*P. indicus*) merupakan jenis udang yang habitatnya berada pada kedalaman 90 meter dari permukaan laut. Penyebaran udang ini meliputi daerah Afrika Timur dan Afrika Tenggara ke Cina selatan melalui Malaysia dan Indonesia ke New Guinea dan Australia Utara. Jenis ini menjadi basis perikanan komersial utama di Afrika Timur, India, Malaysia, Thailand dan Indonesia.

2. 5. Cumi-cumi (*Loligo vulgaris*)

Cumi-cumi termasuk hewan mempunyai nilai ekonomi penting dan menduduki urutan ketiga didalam dunia perikanan setelah ikan dan udang, Dagingnya terlihat bersih, licin, menarik perhatian, mempunyai aroma yang khas, serta diketahui mengandung gizi yang cukup tinggi. Selanjutnya dikemukakan pula bahwa penduduk di berbagai negara memanfaatkan Cumi-cumi sebagai bahan makanan, antara lain Jepang, Korea, Indonesia, Malaysia dan Taiwan (Anonim, 2009).

Taksonomi Cumi-cumi adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Animalia
 Kelas : Cephalopoda
 Family : Mollusca
 Genus : *Loligo*
 Spesies : *Loligo vulgaris*

Cumi-cumi termasuk hewan tak bertulang belakang yang tidak memiliki tulang dalam tubuhnya. Namun, mereka mempunyai kemampuan gerak luar biasa berkat adanya sistem yang sangat unik pada tubuhnya. Tubuh lunak cumi-cumi tertutupi oleh lapisan jaket tebal. Di bawah lapisan ini, air disedot dan disemburkan keluar oleh otot-otot kuat, sehingga menjadikannya mampu bergerak mundur.

Pada kedua sisi kepalanya terdapat lubang mirip kantong. Air disedot melalui lubang ini dan masuk ke dalam rongga berbentuk tabung atau silinder dalam tubuhnya. Lalu ia menyemburkan air ini keluar dengan tekanan tinggi melalui sebuah pipa kecil yang terletak persis di bawah kepalanya, sehingga ia dapat bergerak cepat dalam arah berlawanan akibat gaya reaktif, yakni gaya dorong yang berlawanan arah dengan arah semburan air (Anonim, 2009).

2. 6. Kepiting (*Scylla serrata*)

Scylla serrata merupakan sejenis kepiting yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat selain Rajungan (*Portunus pelagicus*). *Scylla serrata* dikenal dengan nama mud crab. Kepiting digemari oleh masyarakat karena rasanya yang enak dan

nilai gizinya yang tinggi. Spesies lain dari kepiting yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat adalah *S. tranquebarica* dan *S. oceanica*.

Taksonomi kepiting (*Scylla serrata*) adalah sebagai berikut: (Rangka, 2005)

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Ordo	: Decapoda
Famili	: Portunidae
Genus	: <i>Scylla</i>
Species	: <i>Scylla serrata</i>

Bila kondisi ekologi mendukung, kepiting bakau dapat bertahan hidup hingga mencapai umur 3 - 4 tahun. Sementara itu pada umur 12 - 14 bulan kepiting sudah dianggap dewasa dan dapat dipijahkan. Sekali memijah, kepiting bisa menghasilkan jutaan telur tergantung ukuran induk. Dalam bebas, jumlah larva yang mampu menjadi kepiting muda sangat kecil karena faktor lingkungan yang tidak mendukung dan banyaknya musuh alami. Sekali melakukan pemijahan kepiting betina mampu menyimpan sperma jantan dan dapat melakukan pemijahan hingga tiga kali tanpa perkawinan lagi (Irmawati, 2006).

Kepiting adalah hewan berkulit keras, sehingga pertumbuhannya dicirikan oleh proses ganti kulit (moulting). Kepiting bakau mempunyai 10 buah (lima pasang) kaki, pasangan kaki pertama disebut capit yang berperan sebagai alat penangkap/pemegang makanan, pasangan kaki kelima berbentuk seperti kipas (pipih) berfungsi sebagai kaki renang dan pasangan kaki selebihnya sebagai kaki jalan. Dengan capit dan kaki jalan, kepiting bisa berlari cepat di darat dan berbekal kaki renang dapat berenang dengan cepat di air sehingga tergolong

Swimming Crab (Portunidae). Berwarna kemerahan hingga orange terutama pada capit dan kakinya, kepiting jantan dicirikan oleh bagian abdomen yang berbentuk agak lancip menyerupai segitiga sama kaki, sedangkan pada kepiting betina dewasa agak membundar dan melebar. Pada kepiting dewasa, yang jantan memiliki ukuran capit lebih besar dibandingkan dengan betina untuk umur yang sama demikian pula halnya dengan ukuran tubuhnya (Rangka, 2005).

Sesuai dengan namanya, kepiting mempunyai habitat hidup di daerah pantai dengan vegetasi bakau di sekitar muara sungai. Kepiting memiliki penyebaran yang sangat luas yaitu meliputi perairan wilayah Indopasifik. Di Indonesia dengan potensi hutan bakau yang sangat besar (4,25 juta ha) tersebar di beberapa pulau seperti Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku dan Irian Jaya, diduga merupakan habitat dan fishing ground kepiting (Rangka, 2005).

2.7. Polimerase Chain Reaction (PCR) (Jamsari, 2007 ; Yuwono, 2006).

Reaksi berantai polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti di perusahaan CETUS Corporation. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA (Jamsari, 2007; Yuwono, 2006).

Metode PCR tersebut sangat sensitif. Sensivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan metode PCR dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 20 menit (Mullis dan Faloona, 1989). Hal ini menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sedikit, misalnya DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 μg , oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 μl . DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom. Bakteri hanya dengan mencampur kultur bakteri di dalam tabung PCR.

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus di ketahui terlebih dahulu sebelum proses perlipatgandaan tersebut dapat di lakukan. Sekuen yang di ketahui tersebut penting untuk menyediakan *primer*, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. Pengembangan lebih lanjut metode PCR memungkinkan di lakukannya pelipatgandaan suatu Fragmen DNA yang belum di ketahui sekuennya, misalnya dengan metode Alu-PCR (Rosenthal, 1992).

2.7.1. Prinsip Dasar PCR

Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) oligonukleotida *primer*, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang di gunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain juga penting adalah senyawa buffer.

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA di mulai dengan melakukan denaturasi *template* (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda (*double stranded*) akan terpisah menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Denaturasi DNA di lakukan dengan menggunakan panas (95°C) selama 1 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga *primer* akan "menempel" (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. Suhu 55°C yang di gunakan untuk penempelan *primer* pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika di lakukan pada suhu yang lebih rendah (37°C), tetapi biasanya akan menjadi *mispriming* yaitu penempelan *primer* pada tempat yang salah. Pada suhu lebih tinggi (55°C), spesifisitas reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiesinya akan menurun.

Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada

ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Proses *annealing* biasanya dilakukan selama 1-2 menit . Setelah dilakukan *annealing* oligonukleotida *primer* dengan DNA cetakan, suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72°C selama 1,5 menit. Pada suhu ini DNA polimerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Setelah terjadi polimerasi selanjutnya akan didenaturasi lagi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95°C. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya akan berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerasi.

Reaksi-reaksi seperti yang sudah dijelaskan tersebut diulangi lagi sampai 25-30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target di dalam campuran reaksi. Paling tidak, diperlukan 25 siklus untuk melipatgandakan satu kopi sekuen DNA target di dalam DNA genom mamalia agar hasilnya dapat dilihat secara langsung, misalnya dengan elektroforesis gel agarose. Akan tetapi, pada umumnya konsentrasi DNA polimerase *Taq* menjadi terbatas setelah 25-30 siklus amplifikasi (Sambrook *et al.*, 1989).

Siklus reaksi seperti di atas dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa waterbath biasa yang masing-masing diatur suhunya. Tabung reaksi yang digunakan untuk melakukan PCR kemudian diinkubasikan pada waterbath tersebut sesuai suhu dan lama inkubasi. Akan tetapi, proses yang dilakukan secara manual tersebut mempunyai kelemahan, antara lain ketepatan waktu inkubasi yang cenderung rendah, sehingga sekarang setelah dikembangkan alat yang dapat

diprogram secara jauh lebih tepat untuk melakukan inkubasi pada suhu yang berbeda-beda dengan waktu yang berbeda-beda pula. Berbagai macam model dan tipe alat PCR telah dikembangkan dengan aplikasi yang beragam, mulai yang sederhana sampai yang bersifat real-time PCR.

2.7.2. DNA Polimerase yang digunakan dalam PCR.

Pada awal perkembangannya DNA polimerase yang digunakan dalam PCR adalah fragmen Klenow DNA polimerase I yang berasal dari *Escherichia coli* (Mullis dan Faloona, 1989). Fragmen Klenow adalah DNA polimerase yang telah dihilangkan aktivitas eksnuklease (5'-3')nya. Beberapa kelemahan fragmen Klenow antara lain adalah bahwa enzim ini tidak tahan panas, laju polimerasinya termasuk sedang, dan prosesivitasnya rendah. Prosesivitas adalah kemampuan suatu enzim polimerase untuk menggabungkan nukleotida dengan suatu *primer* secara terus-menerus tanpa terdisosiasi dari kompleks *primer* DNA cetakan. Hampir semua DNA polimerase mempunyai prosesivitas yang rendah sehingga akan terdisosiasi dari kompleks *primer* DNA cetakan setelah menggabungkan kurang dari 10 nukleotida. Salah satu perkecualian adalah T7 DNA polimerase yang mampu menggabungkan ribuan nukleotida tanpa terdisosiasi dari kompleks *primer*–DNA cetakan.

2.7.3. Taq DNA Polimerase

Oleh karena salah satu tahapan PCR adalah denaturasi DNA cetakan dengan menggunakan suhu tinggi (95°C) maka diperlukan suatu enzim DNA polimerase yang tetap aktif meskipun mengalami inkubasi pada suhu tinggi.

Alternatif bagi fragmen Klenov yang kemudian digunakan dalam PCR adalah DNA polimerase yang berasal dari mikrobial termofilik, yaitu Taq DNA polimerase yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*, yaitu suatu strain yang tidak mempunyai endonuklease restriksi TaqI. Taq DNA polimerase tersusun atas satu rantai polipeptida dengan berat molekul kurang lebih 95 kD. Enzim ini mempunyai kemampuan polimerase DNA yang sangat tinggi, tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 3' → 5'. Enzim ini paling aktif pada pH 9 (pada suhu 20°C) dan suhu aktivitas optimumnya sekitar 75 °C - 80 °C.

Kelebihan enzim Taq DNA polimerase adalah bahwa enzim ini tahan terhadap suhu tinggi yang diperlukan untuk memisahkan rantai DNA cetakan. Dengan kelebihan semacam ini maka tidak diperlukan penambahan enzim pada tiap-tiap siklus PCR seperti yang harus dilakukan kalau enzim yang digunakan adalah fragmen Klenow DNA polimerase I (Gelfand dan White, 1990). Kelebihan lain enzim Taq Polimerase adalah laju polimerasinya yang tinggi serta prosesivitasnya yang juga lebih tinggi dibanding dengan fragmen Klenow.

Taq DNA Polimerase mempunyai suhu optimum yang tinggi untuk sintesis DNA yaitu 75 °C - 80 °C. Aktivitas spesifik enzim ini dalam menggabungkan nukleotida mencapai 150 nukleotida per detik per molekul enzim. Waktu paruh (half life) Taq polimerase pada suhu 95°C adalah 40 menit (Gelfand dan White, 1990). Deterjen non-ionik Tween 20 (0,5-1%) dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi Taq DNA Polimerase. Senyawa tambahan lain yang juga dapat meningkatkan efisiensi polimerasi Taq DNA Polimerase adalah DMSO, gelatin, gliserol dan ammonium sulfat. Enzim ini diketahui dapat menggunakan deoksiribonukleosida triphosphat yang sudah

dimodifikasi sebagai substrat dan dapat digunakan untuk melabel fragmen DNA, misalnya dengan radionukleotida, digoxigenin, biotin, atau fluorescein. Taq DNA Polimerase juga dapat digunakan untuk melakukan sekuensing DNA (DNA *sequencing*).

Salah satu kelemahan enzim Taq DNA polimerase adalah bahwa enzim tersebut mempunyai potensi untuk melakukan kesalahan dalam menggabungkan nukleotida sehingga ada kemungkinan terjadi mutasi pada fragmen gen hasil amplifikasi. Meskipun demikian dengan kondisi yang tepat, kesalahan penggabungan nukleotida semacam itu tidak terjadi seperti misalnya hasil amplifikasi fragmen gen HIV-1 (5400 nukleotida) dengan siklus amplifikasi 30 kali.

Taq DNA polimerase mempunyai keunikan yaitu bahwa enzim ini mampu menambahkan satu nukleotida, terutama dATP, pada ujung 3' fragmen DNA hasil polimerisasi meskipun tanpa ada cetakannya (Clark, 1988). Dengan demikian, ujung fragmen DNA hasil polimerisasi dengan metode PCR pada umumnya tidak tepat (*blunt-ended*), melainkan ada tambahan satu nukleotida pada kedua ujungnya. Kenyataan semacam ini mempunyai implikasi penting karena fragmen DNA hasil polimerisasi dengan metode PCR dapat diligasikan dengan suatu plasmid vektor tertentu tanpa menggunakan enzim DNA ligase. Hal ini juga perlu diperhatikan jika fragmen DNA hasil PCR akan diligasikan dengan suatu plasmid dengan menggunakan metode ligasi pepat (*blunt-end ligation*). Sebelum dilakukan ligasi, fragmen DNA tersebut harus dibuat pepat/tumpul dengan menggunakan aktivitas polimerase 5 \rightarrow 3' fragmen klenow.

Aktivitas Taq DNA polimerase dipengaruhi oleh konsentrasi ion magnesium. Aktivitas Taq DNA polimerase mencapai maksimal pada konsentrasi MgCl_2 sebesar 2,0 mM jika konsentrasi dNTP yang digunakan adalah 0,7-0,8 mM. Konsentrasi Mg^{2+} lebih tinggi dari 2,0 mM akan menghambat aktivitas Taq DNA polimerase. Disamping itu, aktivitas enzim polimerase ini juga akan menurun 20-30% jika konsentrasi total dNTP yang digunakan mencapai 4-6 mM (Gelfand dan White, 1990).

Konsentrasi Taq DNA polimerase yang dianjurkan untuk melakukan PCR adalah antara 1-2 unit per 50-100 μl reaksi. Untuk reaksi yang berbeda, enzim yang diperlukan mungkin berbeda. Oleh karena itu sebaiknya dilakukan pengujian dengan melakukan variasi konsentrasi enzim kemudian dicek dengan elektroforesis pada gel agarose. Jika konsentrasi enzim terlalu tinggi maka akan diperoleh produk nonspesifik yang terlalu besar, sedangkan jika konsentrasi terlalu rendah maka produk yang diharapkan juga akan terlalu sedikit.

2.7.4. Pengembangan teknik PCR (Jamsari, 2007)

Sejak pertama kali diperkenalkan, teknik PCR telah berkembang sangat pesat dan diaplikasikan untuk bermacam-macam tujuan, baik untuk riset dasar maupun aplikasi praktik. Pada aspek metodologinya, teknik PCR yang pertama kali diperkenalkan memerlukan banyak kondisi khusus untuk menjamin keberhasilannya. Sebagai contoh, pada awalnya teknik PCR hanya digunakan untuk mengamplifikasi molekul DNA akan digunakan sebagai cetakan. Dalam hal ini molekul DNA yang akan diamplifikasi harus diisolasi terlebih dahulu dari sel atau jaringan. Perkembangan lebih lanjut teknik ini memungkinkan para peneliti

berkembangnya Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR). Selain itu, sekarang juga sudah dikembangkan teknik PCR yang tidak memerlukan langkah isolasi molekul DNA terlebih dahulu sebelum diamplifikasi. Dalam hal ini PCR dapat dilakukan dengan menggunakan sel atau jaringan sebagai bahan awal tanpa harus melakukan isolasi DNA secara khusus. Dengan teknik ini, PCR dapat dilakukan dalam sel atau jaringan tersebut sehingga teknik ini dikenal sebagai PCR in situ.

2.8. Elektroforesis (Jamsari, 2007; Old, 1989).

Teknik elektroforesis merupakan salah satu teknik pemisahan molekul dengan menggunakan arus listrik yang memanfaatkan prinsip perbedaan berat/besar molekul. Teknik tersebut dapat diterapkan untuk molekul-molekul seperti protein, asam nukleat dan partikel-partikel virus. Disamping berdasarkan berat atau besar molekulnya, teknik elektroforesis juga dapat digunakan untuk memisahkan molekul-molekul yang didasarkan kepada jenis muatan listrik dan titik isoelektriknya. Prinsip dasar pemisahan molekul tersebut diamati dari derajat perpindahan atau migrasi yang disebabkan oleh adanya perbedaan berat molekulnya.

Senyawa agarose adalah bahan yang sering dan banyak digunakan dalam teknik elektroforesis. Bahan ini merupakan senyawa disakarida dari D-galaktosa dan 3,6 anhydro-L-Galaktosa dengan kandungan senyawa sulfat yang rendah. Senyawa agarose diisolasi dari rumput laut yang untuk pertama kalinya dilakukan di Jepang. Beberapa faktor yang menentukan dalam penggunaan elektroforesis adalah berat molekul, konsentrasi gel, bentuk konformasi dari molekul DNA dan kekuatan arus listrik yang digunakan. Senyawa-senyawa yang

memiliki berat molekul lebih besar akan bermigrasi lebih lambat dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang memiliki berat molekul lebih kecil. Oleh karena DNA memiliki muatan negatif maka arah migrasi molekul DNA akan berpindah dari kutub negatif menuju kutub positif. Konsentrasi gel akan menentukan besarnya pori-pori yang akan dilalui molekul DNA. Semakin besar konsentrasi agarose yang digunakan, berarti semakin kecil pori-pori yang akan dilalui, sehingga laju migrasi molekul DNA juga akan semakin lambat.

Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan proses pewarnaan (*staining*) dengan menggunakan etidium bromida untuk mendeteksi posisi migrasi fragmen DNA setelah gel ini disinari dengan cahaya ultraviolet.

2.9. Antibiotika

Penemuan sulfonamida oleh Paul Ehrlich pada tahun 1908 menjadi pembuka jalan menuju pengembangan zat antimikroba, yaitu zat yang bermanfaat secara selektif menghancurkan mikroba tertentu tanpa menimbulkan kerusakan yang berarti pada sel inang. Banyak senyawa ini dibuat secara sintesis di laboratorium sedangkan yang lain terbentuk sebagai senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri atau fungi. Antibiotika didefinisikan sebagai senyawa sintesis ataupun senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme hidup yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme (Christine, 2008, Mutshler, 1991). Antibiotika termasuk obat yang paling umum digunakan. Sebagai contoh, dari seluruh pasien di rumah sakit, 30% atau lebih diobati dengan satu atau lebih rangkaian terapi antibiotika (Goodman, 2006).

2.9.1. Klasifikasi Antibiotika

Antibiotika dapat diklasifikasikan berdasarkan pendekatan kimia, mekanisme kerja antibiotika, sasaran kerja antibiotika dan daya kerja antibiotika (Ganiswara, 1995, Wattimena, 1991).

1. Pendekatan Kimia

- a. β -Laktam, terdiri dari 2 kelompok, yaitu kelompok penisilin dan sefalosporin.
 - kelompok penisilin, contohnya ampisilin, penisilin G dan amoksisilin.
 - kelompok sefalosporin, contohnya sefalotin, sefuroksim dan sefaleksim.
- b. Aminoglikosida, contohnya streptomisin, kanamisin, gentamisin, neomisin dan lain-lain.
- c. Kloramfenikol, contohnya kloramfenikol dan tiamfenikol.
- d. Kelompok tetrasiklin, contohnya tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, demetilklortetrasiklin, rolitetrasiklin, metasiklin, doksisisiklin dan minosiklin.
- e. Makrolida dan antibiotika yang berdekatan, contohnya eritromisin, linkomisin, oleandomisin dan klindamisin.
- f. Rifampisin contohnya rifamisin dan rifampisin.
- g. Polipeptida siklik, contohnya polimiksin B, polimiksin E dan basitrasin.
- h. Antibiotika polien, contohnya nistatin dan amfoterisin B.
- i. Antibiotika lain, contohnya vankomisin dan novobiosin.

2. Mekanisme Kerja Antibiotika

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibiotika dibagi menjadi lima golongan, yaitu (Christine, 2008) :

a. Antibiotika yang menghambat metabolisme sel bakteri

Bakteri memerlukan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Asam folat ini disintesis dari asam para aminobenzoat (PABA) dalam tubuh bakteri. Antibiotika golongan ini bekerja dengan membentuk analog asam folat yang nonfungsional, akibatnya kehidupan bakteri akan terganggu, maka diperoleh efek bakteristatik. Contoh golongan ini: sulfonamida, trimetoprim, asam P-aminosalisilat (PAS) dan sulfon.

b. Antibiotika yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan, yaitu suatu kompleks polimer muko peptida (glikopeptida). Antibiotika golongan ini bekerja dengan menghambat proses transpeptidasi rantai peptidoglikan tersebut. Tekanan osmotik didalam sel bakteri lebih tinggi dibanding diluar sel, kerusakan dinding sel bakteri mengakibatkan terjadinya lisis, maka diperoleh efek bakterisida. Contoh antibiotika golongan ini antara lain sikloserin, basitrasin, vankomisin, penisilin dan sefalosporin.

c. Antibiotika yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri.

Antibiotika golongan ini bekerja dengan merusak sel bakteri setelah bereaksi dengan gugus fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri, contohnya polimiksin. antibiotika golongan ini dapat pula berikatan dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran sel tersebut, contohnya adalah antibiotika polien.

d. Antibiotika yang menghambat sintesis protein sel bakteri.

Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein yang berlangsung didalam ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Ribosom bakteri terdiri dari dua unit yaitu ribosom 30s dan 50s. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen tersebut harus bersatu pada pangkal rantai mRNA membentuk ribosom 70s. antibiotika golongan ini bekerja dengan mengganggu ikatan kedua komponen tersebut sehingga kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada saat sintesis protein, akibatnya terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri. Contoh antibiotika golongan ini antara lain golongan aminoglikosida, makrolida, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol.

e. Antibiotika yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.

Antibiotika golongan ini dapat berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut, contohnya adalah antibiotika rifampisin. Cara kerja yang lain adalah dengan menghambat enzim DNA girase pada bakteri yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga dapat masuk ke dalam sel bakteri tersebut, contohnya adalah antibiotika golongan Quinolon.

3. Sasaran Kerja Antibiotika

Antibiotika dapat dibagi tiga berdasarkan manfaat dan sasaran kerja yaitu :

a. Antibiotika yang efektif terhadap kokus dan basil gram (+)

Antibakteri golongan ini cenderung memiliki spektrum aktifitas yang sempit, contohnya makrolida, linkomisin, vankomisin dan basitrasin.

- b. Antibiotika yang efektif terhadap basil aerob gram (-), contohnya aminoglikosida dan polimiksin.
- c. Antibiotika yang relatif memiliki spektrum kerja yang luas, bermanfaat terhadap kokus gram (+) dan basil gram (-), contohnya tetrasiklin dan kloramfenikol.

4. Daya kerja Antibiotika

Antibiotika dibagi menjadi dua kelompok besar berdasarkan daya kerjanya, yaitu :

a. Aktifitas bakteriostatik

Antibiotika kelompok ini bersifat menghambat pertumbuhan bakteri, bekerja pada gangguan proses sintesa protein bakteri.

b. Aktifitas bakterisida

Antibiotika kelompok ini bersifat membunuh bakteri, bekerja mempengaruhi proses pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bakteri.

2.9.2. Resistensi terhadap Antibiotika

Antibiotika yang efektif dan aman telah berkembang begitu pesat sehingga dapat mengurangi mortalitas akibat penyakit infeksi secara drastis. Keberhasilan tersebut sedikit terganggu dengan munculnya *strain-strain* mikroba yang mampu membentuk pertahanan terhadap antibiotika tertentu. Hal ini tidaklah mengherankan karena organisme hidup selalu beradaptasi dengan lingkungannya. Oleh karena itu adaptasi mikroorganisme terhadap antibiotika toksik juga tak terelakkan, sehingga resistensi mikroba terhadap zat penghambat pertumbuhan

tersebar semakin luas dan dapat menjadi ancaman keberhasilan memberantas penyakit infeksi. Apalagi bila penggunaan antibiotika kurang terkontrol, resistensi akan semakin meningkat(Davies, 1981).

Resistensi atau kepekaan sebenarnya bukanlah sifat yang mutlak tetapi tergantung pada konsentrasi antibiotika. Setiap organisme mempunyai batas konsentrasi antibiotika yang menunjukkan kepekaan mereka, di atas batas berarti peka dan di bawah batas berarti resisten. Perbedaan kepekaan organisme sama lain yaitu pada konsentrasi penghambatan minimum. Sebagai contoh, umumnya bakteri gram positif dianggap lebih peka terhadap penisilin, sedangkan bakteri gram negatif dianggap lebih resisten. Padahal kenyataannya kedua kelompok tersebut peka terhadap penisilin. Perbedaan konsentrasi penghambatan minimum gram positif berkisar 1 unit/ml, sedangkan gram negatif berkisar 1000 unit/ml. Konsentrasi penghambatan minimum ini sangat penting karena pada pemberian antibiotika, konsentrasi tersebut harus dapat tercapai di tempat target. Sifat resistensi atau kepekaan mikroorganisme terhadap antibiotika terdapat pada gen, maka dikenal resistensi kromosomal dan resistensi ekstrakromosomal. Adapula resistensi non genetik yaitu bakteri pada stadium istirahat, sehingga mereka tidak peka terhadap antibiotika. Sifat genetik yang menentukan suatu mikroorganisme sejak awal tidak peka terhadap antibiotika, dikenal sebagai resistensi inheren. Selain itu organisme yang semula peka terhadap suatu antibiotika, pada suatu saat dapat berubah sifat genetiknya menjadi tidak peka atau memerlukan konsentrasi lebih besar. Perubahan ini karena gen mendapatkan elemen genetik yang membawa sifat resistensi. Resistensi ini dikenal sebagai resistensi *acquired*. Pada prinsipnya Ketiga macam pola kepekaan

mikroorganisme terhadap antibiotika; yaitu mikroba belum pernah terjadi resistensi, mikroba berubah sifat dari peka menjadi kurang peka dan mikroba resisten terhadap antibiotika (Franklin, 1977).

Resistensi mikroba juga dapat terjadi secara silang yaitu resistensi mikroorganisme terhadap antibiotika tertentu juga memperlihatkan resistensi terhadap antibiotika lain. Resistensi silang biasanya terjadi di antara antibiotika yang mempunyai struktur kimia hampir sama seperti derivat penisilin, tetapi juga dapat terjadi pada antibiotika dengan struktur sangat berbeda. Berkembangnya resistensi mikroba terhadap antibiotika meliputi perubahan genetik, sehingga resistensi tersebut dapat diturunkan dari generasi ke generasi. Ada banyak hal yang dapat menyebabkan resistensi; mutasi merupakan penyebab yang sering dijumpai, selain itu resistensi juga dapat diperoleh melalui transfer bahan genetik dari bakteri resisten seperti transduksi, transformasi atau konjugasi. Mutasi gen dapat terjadi secara spontan tanpa adanya antibiotika yang bersangkutan dan mikroorganisme tersebut dapat berubah menjadi resisten. Mutasi selain dapat menimbulkan resistensi, juga dapat menyebabkan perubahan virulensi dan patogenisitas mikroba tersebut; bisa berkurang atau meningkat.

Transduksi terjadi dengan perantaraan bakteriofag. Intervensi bakteriofag menyebabkan DNA bakteri masuk ke bakteri lain; jika bahan genetik tersebut membawa gen yang menimbulkan sifat resistensi, maka sel bakteri yang terinfeksi tersebut akan menjadi resisten terhadap antibiotika tertentu. Transduksi banyak dilaporkan sebagai cara pemindahan sifat resistensi antibiotika yang sering terjadi di antara *strain Staphylococcus aureus*, di mana phage dapat membawa plasmid (DNA ekstra kromosom) pengkode penisilinase.

Konjugasi merupakan pemindahan gen resisten dari satu sel ke sel lain dengan kontak langsung melalui *sexpilus*. Mekanisme ini sangat penting sebagai salah satu cara penyebaran gen resisten antibiotika, terutama *bacilli* gram negatif. Di antara mikroorganisme yang diketahui mampu memindahkan gen resisten ke bakteri peka dengan cara ini antara lain *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Vibrio cholerae* dan *Pseudomonas* (Richmond *et.al.*, 1981).

Berkembangnya resistensi mikroba dengan cara ini antara lain terjadi pada aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol dan penisilin. Penyebaran resistensi dengan konjugasi pada bakteri gram negatif yang terdapat pada binatang dan manusia, merupakan ancaman untuk membasmi penyakit infeksi yang disebabkan oleh organisme gram negatif. Bakteri gram negatif dapat memindahkan sifat resistensi, tidak hanya ke spesies yang sama tetapi juga ke spesies atau genus berbeda. Transformasi mungkin juga merupakan mekanisme terjadinya resistensi.

Di samping itu fusi antara dua sel mungkin juga menjadi cara berkembangnya resistensi. Fusi mungkin dapat terjadi antara dua spesies yang berbeda, bergabung membentuk struktur tunggal dan sel baru mengandung DNA dari kedua sel induk. Dari cara-cara tersebut, transduksi dan konjugasi merupakan cara yang paling lazim sebagai penyebab penyebaran mikroba resisten; namun potensi gen resisten juga dipengaruhi oleh lokasi gen dalam bakteri. Jika gen merupakan bagian dari plasmid, maka pemindahan sifat resisten akan lebih mungkin terjadi daripada apabila gen ada dalam kromosom.

2.9.3. Mekanisme Resistensi Mikroba (Desselberg, 1998)

Mekanisme terjadinya resistensi terhadap senyawa antimikroba antara lain :

- 1). Mikroba mensintesis enzim yang dapat mengubah zat aktif menjadi tidak aktif.

Contoh resistensi yang terjadi akibat mikroba mensintesis enzim yaitu resistensi mikroba terhadap penisilin. Organisme tersebut menghasilkan enzim penisilinase yang mampu memecah cincin beta-laktam penisilin menjadi *penicilloic acid* yang tidak aktif. Demikian pula sefalosporin juga didegradasi oleh beta-laktamase. Banyak bakteri yang mampu memproduksi betalaktamase, meliputi bakteri gram positif dan negatif. Enzim ini mempunyai peranan besar dalam menyebabkan resistensi bakteri gram positif terhadap penisilin dan sefalosporin. Fisiologi produksi beta-laktamase kebanyakan bakteri gram negatif berbeda dari bakteri gram positif. Bakteri gram negatif umumnya menghasilkan beta-laktamase lebih sedikit dibanding gram positif dalam keadaan diinduksi, kecuali *Enterobacter* dan *Proteus* yang mempunyai beta-laktamase *inducible* sehingga dapat memproduksi enzim cukup banyak. Pada gram negatif umumnya enzim ini terikat sel dan tidak dilepas ke lingkungan sekitarnya (Davies, 1981).

Pada organisme gram positif, beta-laktamase merupakan enzim *inducible*. Dengan adanya penisilin atau sefalosporin, produksinya meningkat. Biasanya pada bakteri gram positif, enzim ini dilepas dari sel dan merusak antibiotika yang ada di sekitarnya. Saat ini telah banyak dikembangkan derivat penisilin yang mempunyai rantai samping berbeda dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri penghasil beta-laktamase yang resisten terhadap benzil penisilin, misalnya methicillin dan carbenicillin, terhadap *S. aureus* yang tidak

memproduksi beta-laktamase, methicillin kurang aktif dibanding benzil penisilin, tetapi aktif terhadap penghasil beta-laktamase. Oleh karena itu antibiotika ini berguna melawan infeksi yang disebabkan bakteri gram positif resisten benzil penisilin. Carbenicillin sedikit aktif terhadap bakteri gram positif, aktivitasnya meningkat terhadap gram negatif, terutama berguna melawan *Pseudomonas* (Li *et al.*, 1967).

Resistensi beberapa *strain* bakteri gram positif dan negatif terhadap kloramphenikol juga terjadi, karena asetilasi menjadi senyawa tidak aktif. *Strain* resisten ini memproduksi kloramphenikol asetiltransferase yang merupakan enzim *inducible* pada *S. aureus*. Resistensi beberapa bakteri gram negatif terhadap berbagai aminoglikosida juga karena inaktivasi secara enzimatis yaitu fosforilasi, adenilasi dan asetilasi. Fosforilasi terjadi pada streptomisin oleh enzim streptomisin phosphotransferase. Enzim ini hanya bekerja pada streptomisin. Neomisin, kanamisin dan paromomisin mengalami fosporilasi dengan adanya enzim neomisin-kanamisin phosphotransferase. Adenilasi juga dapat terjadi pada streptomisin, menjadi derivat adenil oleh enzim streptomisin-spektinomisin adeniltransferase. Enzim gentamisin adeniltransferase dapat merubah gentamisin, kanamisin dan tobramisin menjadi derivat adenil. Asetilasi, misalnya enzim kanamisin asetiltransferase mengasetilasi kanamisin, juga neomisin, gentamisin atau aminoglikosida lain.

2). Terjadinya perubahan pada tempat yang peka terhadap anti mikroba.

Perubahan pada tempat yang peka terhadap antimikroba, juga dapat menyebabkan resistensi mikroba. Contoh mekanisme ini yaitu hilangnya kepekaan ribosom terhadap streptomisin. Disini terjadi perubahan komponen

ribosom subunit 30s, sehingga streptomisin tidak dapat berikatan dalam waktu lama dan akibatnya antibiotika ini tidak dapat mempengaruhi biosintesis protein. Padahal kegiatan antibiotika ini mempengaruhi biosintesis protein pada sel yang peka. Contoh lain yaitu resistensi terhadap eritromisin yang terjadi karena perubahan protein ribosom subunit 50 s pada *S. aureus* (Spratt, 1994).

3). Hilangnya permeabilitas sel terhadap antimikroba.

Hilangnya permeabilitas sel terhadap antibiotika, diduga juga merupakan salah satu cara terbentuknya mikroba resisten. Jika sel menjadi tidak permeabel, maka antibiotika tidak dapat menembus ke dalam sel. Untuk itu perlu tipe antibiotika baru yang dapat menembus sel dengan cara lain misalnya dengan difusi.

Bakteri gram negatif relatif lebih resisten dibandingkan gram positif terhadap antibiotika tertentu, mungkin disebabkan oleh barier permeabilitas yaitu adanya lapisan lipoprotein dan lipopolisakarida pada gram negatif. Sebagai contoh, mutan *E. coli* telah meningkatkan resistensinya terhadap ampisilin dan berkaitan dengan perubahan polisakarida. Beberapa pneumokoki resisten terhadap streptomisin dan eritromisin mungkin juga karena mengembangkan barier permeabilitasnya. Perubahan mekanisme transport antibiotika mungkin juga menyebabkan hilangnya permeabilitas sel terhadap antibiotika. Antibiotika memasuki sel dengan mekanisme transport spesifik. Pada beberapa set resisten, antimikroba gagal memasuki sel karena ada perubahan beberapa komponen yang menyebabkan hilangnya fungsi transport. Misalnya pada mutan *E. coli* yang resisten terhadap D-sikloserin;

path sel yang peka, akumulasi antibiotika ini terjadi dengan sistem transport yang secara normal membawa D-alanin atau glisin (Nikaido, 1994).

- 4). Meningkatnya konsentrasi metabolit yang antagonis kompetitif dengan penghambat.

Resistensi dapat terjadi dengan cara meningkatkan sintesis metabolis yang antagonis kompetitif terhadap antimikroba. Bila senyawa antimikroba menghambat pertumbuhan dengan cara antagonis kompetitif terhadap metabolit normal, maka resistensi terhadap antimikroba ini mungkin karena meningkatnya produksi metabolit tersebut. Secara kompetitif antimikroba digantikan dari tempat ikatannya. Sebagai contoh mutan resisten terhadap sulphonamid. Pada sel ini konsentrasi para amino- benzoic acid lebih tinggi daripada sel yang peka terhadap sulphonamid.

- 5). Mikroba membuat jalan metabolisme baru.

Dengan cara ini mikroorganisme resisten dapat mempertahankan metabolismenya bagi kelangsungan hidupnya. Di samping itu, dalam mempertahankan kelangsungan hidupnya, mikroba dapat membuat jalan metabolisme baru atau lain, untuk menghindari penghambatan antimikroba terhadap jalan metabolisme yang normal, misalnya reaksi baru pada metabolisme nukleotida purin dan pirimidin. Reaksi ini terjadi karena mikroorganisme tersebut menghindari metabolisme normal yang dihambat oleh antimikroba. Sebagai contoh mutan *E. coli* resisten dapat membentuk jalan metabolisme baru dalam mensintesis THFA (asam tetrahidrofolat) karena adanya sulfatiazol.

3.0. Plasmid (Wurtzel, 2002, Wegrzyn, 2004)

Plasmid adalah molekul DNA *double stranded*. Untuk aplikasi terapeutik, dapat mengandung gen manusia atau non manusia, dan berukuran sangat besar antara 1-5% ukuran kromosom bakteri. Plasmid terdistribusi secara luas di antara spesies dan genus bakteri. Pada umumnya bakteri mempunyai suatu kromosom. Kromosom bakteri berupa DNA sirkular atau DNA yang berbentuk lingkaran. Disamping memiliki satu kromosom, berbagai jenis bakteri juga memiliki DNA sirkular lainnya yang ukurannya jauh lebih kecil dari DNA kromosomnya. Jadi, plasmid merupakan DNA bakteri yang terpisah dari kromosom bakteri. Masing-masing untai molekul pDNA adalah polimer linier dari asam deoksiribonukleat dihubungkan dengan ikatan fosfodiester. Gugus fosfat bermuatan negatif pada $\text{pH} > 4$. Untai anti paralel DNA membentuk struktur *double helix* yang distabilkan dengan ikatan hidrogen Watson-Crick antara pasangan basa AT dan GC, dan gaya pengikat. Di bagian dalam heliks bersifat sangat hidrofobik, berisi basa-basa aromatik. Axis heliks pDNA dapat juga membentuk coil, yaitu membentuk molekul pDNA supercoiled (SC). Fraksi populasi molekul pDNA dapat pula berada dalam bentuk non supercoil atau bentuk *open circular* (OC). Varian yang lain yaitu linier, pDNA terdenaturasi atau oligomerik dapat pula ditemukan dalam lisat sel. Bentuk linier dihasilkan dari pemutusan kimia atau enzimatik dari ikatan fosfodiester dalam untai DNA, bentuk terdenaturasi menggambarkan konformasi dimana ikatan hidrogen antara untai yang komplementer pada lokasi tertentu telah rusak, dan oligomer adalah akibat dari rekombinasi homolog.

Plasmid dapat bereplikasi sendiri. Plasmid juga mengandung berbagai gen, jenis, jumlah jenis dan jumlah tiap jenis (copy) plasmid bervariasi antara sel.

Bahkan antar sel dalam satu spesies bakteri plasmid mulai digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen tidak lama setelah David Jackson, Robert Siman dan Paul Berg berhasil membuat molekul DNA rekombinan itu pada tahun 1972. Dalam hal ini plasmid digunakan sebagai pembawa fragmen DNA asing. Dengan kata lain plasmid dikombinasikan dengan DNA asing.

Menurut fungsinya plasmid dapat dikelompokkan menjadi 5 kelas, yaitu:

- a. *Fertility*-(F) Plasmids, merupakan plasmid yang dapat dipindahkan ke bakteri lain dengan cara konjugasi.
- b. *Resistance*-(R) Plasmids, merupakan plasmid yang mengandung gen yang menyebabkan bakteri resisten terhadap antibakteri atau toksin.
- c. *Col*-Plasmids, merupakan plasmid yang mengandung gen yang berfungsi menyandikan kolisin. Kolisin merupakan protein yang dapat membunuh bakteri lain
- d. *Degrative* Plasmids, merupakan plasmid yang berfungsi dalam mendegradasi senyawa-senyawa tertentu, contohnya asam salisilat.
- e. *Virulence* Plasmids, merupakan plasmid yang menyebabkan bakteri menjadi patogen.

Bakteri dapat menunjukkan sifat resistensi terhadap sejumlah antibiotika yang berbeda, dan kemampuan resistensi bakteri ini dapat dipindahkan ke bakteri lain melalui proses kontak antara sel yang satu dengan sel yang lain. Plasmid resistensi (plasmid R) umumnya merupakan plasmid konjugatif dan mengandung gen yang dapat menyebabkan sel bakteri resisten terhadap sulfonamid, streptomisin, klormfenikol, kanamisin, dan tetrasiklin. Plasmid R yang lain mengandung gen resistensi terhadap logam berat seperti merkuri, kobalt,

kadmium, tembaga, arsenik, zink, perak, antimoni, tellurium dan kromium serta resistensi terhadap toksin seluler. Mayoritas factor R mengandung dua kelompok gen, yaitu faktor transfer resistensi (resistance transfer factor, RTF) yang mencakup gen untuk replikasi plasmid dan konjugasi, dan determinan r (r-determinant) yang memiliki gen resistensi dan mengkode produksi enzim untuk inaktivasi obat-obat tertentu atau senyawa-senyawa toksik. Faktor R menyebabkan permasalahan serius pada dunia kedokteran akibat munculnya sifat resistensi mikroorganisme patogen terhadap antibiotika.

Materi genetic dan plasmid dapat dipindahkan atau berpindah melalui berbagai mekanisme, sebagai berikut;

a. Transduksi

DNA dari plasmid masuk ke dalam genom bakteriofage dan oleh bakteriofage tersebut plasmid tadi ditransfer ke populasi kuman lain disekitarnya.

b. Transformasi

Fragmen DNA bebas dapat melewati dinding sel dan kemudian bersatu dalam genom sel tersebut sehingga mengubah genotipenya. Hal ini biasanya dikerjakan di laboratorium dalam penelitian rekayasa genetika.

c. Konjugasi

Transfer unilateral dari materi genetic antara bakteri sejenis maupun dengan jenis lain dapat terjadi melalui proses konjugasi. Hal ini mungkin karena adanya factor F yang menentukan adanya sex pil disebut kuman F^+ , dan melalui pilinya tersebut materi genetic dari sel donor (F^+) termasuk plasmid DNA-nya dapat berpindah ke dalam sel resipien. Jadi

gen-gen tertentu yang membawa sifat resistensi pada obat dapat berpindah dari populasi kuman yang resisten kedalam kuman yang sesitif.

d. Transposisi

Transposisi adalah pemindahan dari rantai DNA pendek antara satu plasmid ke plasmid lain, atau dari kromosom ke plasmid dalam sel tersebut.

Plasmid berbeda dari kromosom bakteri karena plasmid hampir selalu membawa satu gen atau lebih yang umumnya tidak esensial bagi pertumbuhan sel dalam kondisi normal. Namun demikian, sering kali gen plasmid membawa ciri-ciri penting bagi bakteri inang. Misalnya, kemampuan hidup didalam antibiôtika dengan konsentrasi yang bisanya toksik seperti pada kloramfenikol atau ampisilin seringkali disebabkan oleh adanya plasmid yang membawa gen resisten antibiotika didalam bakteri.

Plasmid dapat dibedakan plasmid konjugatif dan plasmid nonkonjugatif. Plasmid konjugatif ditandai oleh kemampuannya untuk memacu konjugasi seksual di antara sel-sel bakteri, yang merupakan proses yang dapat mengakibatkan penyebaran plasmid konjugatif dari satu sel ke sel yang lain dalam kultur bakteri. Konjugasi plasmid diatur oleh gen transfer (*gen tra*) yang terdapat pada plasmid konjugatif, Namun tidak terdapat pada plasmid non konjugatif. Namun demikian, plasmid nonkonjugatif dapat ditransfer bersama plasmid konjugatif bila keduanya berada dalam sel yang sama. Konjugasi dibedakan dari transformasi berdasarkan dua ciri. Ciri pertama adalah konjugasi memerlukan kontak langsung sel ke sel, dan ciri kedua adalah sel donor harus membawa plasmid sedangkan sel resipien tidak. Pada bakteri gram negatif, proses konjugasi

melibatkan pili seks yang merupakan perpanjangan dari permukaan sel donor yang akan melekat pada permukaan sel resipien. Pada bakteri gram positif, proses konjugasi umumnya berupa kontak langsung antara dinding sel donor dengan dinding sel resipien. Pada permukaan sel gram positif dihasilkan molekul permutan yang lengket yang memungkinkan kontak antara sel donor dan sel resipien secara langsung.

Pada *Escherichia coli*, faktor F (faktor fertilitas), merupakan plasmid yang pertama kali diteliti untuk dipindahkan dari sel bakteri yang satu ke sel bakteri yang lain melalui proses konjugasi. Faktor F merupakan contoh plasmid konjugatif. Sel donor yang membawa faktor F (sel F^+) mentransfer plasmid melalui pili seks ke sel resipien (sel F^-). Hasilnya sel resipien akan berubah menjadi sel F^+ . Pada beberapa sel yang membawa faktor F, faktor F ini terintegrasi di dalam kromosom dan mengubah sel F^+ menjadi sel Hfr (*high frequency of recombination*). Pada saat proses konjugasi antara sel Hfr dengan sel resipien (sel F^-), kromosom sel Hfr (dengan faktor F yang terintegrasi di dalamnya) bereplikasi dan rantai induk kromosom ditransfer ke sel resipien. Replikasi kromosom sel Hfr dimulai dari bagian tengah faktor F yang terintegrasi. Umumnya kromosom akan putus sebelum kromosom ditransfer. DNA donor akan bergabung dengan DNA sel resipien dan DNA donor yang tidak terintegrasi akan didegrasi, sehingga melalui proses konjugasi dengan sel Hfr ini, sel F^- akan mendapatkan versi baru gen kromosomal (serupa dengan proses transformasi), Namun tidak mengubah sifat sel resipien (sel F^-) karena sel resipien tersebut tidak mendapatkan faktor F secara lengkap selama proses konjugasi, sehingga tidak dapat berubah sifat menjadi sel F^+ .

Banyak bakteri dapat menghasilkan protein yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang lain. Protein ini disebut bakteriosin, dikode oleh plasmid bakteriosin dan memiliki kemampuan spesifik terhadap spesies-spesies tertentu. Bakteriosin telah diisolasi dari *Escherichia coli* (kolisin), *Pseudomonas aeruginosa* (pyosin), *Bacillus megaterium* (megasin) dan beberapa spesies bakteri lainnya.

Plasmid dapat mengkode protein yang meningkatkan patogenitas bakteri. Misalnya, strain *Escherichia coli* yang menyebabkan diare pada anak-anak membawa plasmid yang mengkode produksi toksin serta perlekatan pada sel intestinal. Tanpa plasmid ini, *E.coli* tidak berbahaya dan tidak bersifat patogen. Toksin-toksin bakteri lain yang dikode oleh gen pada plasmid adalah toksin antraks dari *Bacillus anthracis*, neurotoksin dari *Clostridium tetani*, dan toksin eksfoliatif dari *Staphylococcus aureus*. Plasmid dapat juga membawa gen reaksi kimia khusus. Misalnya, plasmid dapat membawa gen yang mengkode enzim pengkatalis reaksi degradasi senyawa kimia sintetik yang tidak terdapat secara alami di alam (xenobiotik). Senyawa ini meliputi komponen aromatik dan hidrokarbon dengan substituen halogen, misalnya herbisida, fungisida dan insektisida.

Transposon merupakan segmen kecil DNA yang dapat bergerak atau berpindah dari satu daerah ke daerah lainnya pada molekul DNA. Potongan DNA ini memiliki panjang berkisar antara 700 hingga 40.000 basa dan mempunyai kemampuan untuk bergerak menelusuri kromosom dan elemen gen ekstrakromosomal, misalnya plasmid. Transposon ditemukan pada sekitar tahun 1950-an oleh seorang ilmuwan genetika Amerika bernama Barbara McClintock

yang menemukan fenotipe nonstabil pada jagung yang menunjukkan adanya elemen genetik mobil. Elemen tersebut dinamakan elemen pengatur, tetapi istilah yang sekarang digunakan adalah transposon elements (elemen yang dapat dipindahkan). Seluruh transposon mengandung informasi yang berguna bagi proses transposisinya. Transposon sederhana yaitu sekuens sisipan (*insertion sequences*, IS) mengandung hanya satu gen yang mengkode enzim transposase yang mengkatalisis pemotongan dan penyambungan DNA yang timbul dalam proses transposisi, serta tapak pengenalan. Tapak pengenalan adalah sekuens DNA pendek berulang yang dikenal oleh enzim sebagai tapak rekombinasi antara transposon dan kromosom. Transposon kompleks membawa gen-gen lain yang tidak berhubungan dengan proses transposisi. Misalnya, transposon bakteri dapat mengandung gen-gen untuk enterotoksin atau resistensi antibiotika.

3.0.1. Biosintesis dan Isolasi (Sambrook, 1989)

Plasmid dibiosintesis secara replikasi otomatis dalam *Escherichia coli*, suatu bakteri yang aman digunakan dalam bio-industri sebagai produser beberapa protein rekombinan. Meskipun beberapa teknik dapat digunakan untuk merusak sel *E. coli*, untuk melepaskan molekul pDNA (<1% massa sel kering), metode yang paling banyak digunakan adalah lisis basa. Lisis basa adalah perusakan sel pada pH tinggi dengan NaOH dan SDS, diikuti dengan pelepasan dan denaturasi DNA genomik (gDNA), material dinding sel, dan kebanyakan protein seluler. Meskipun pDNA SC juga terpengaruh karena rusaknya ikatan hidrogen akibat promosi basa, jika pH dijaga di bawah 12,5, pasangan basa terjaga dari pemisahan sempurna untai komplementer. Basa-basa berperan sebagai *nuclei* untuk

renaturasi sempurna molekul pDNA selama tahap netralisasi. Jika lisis sel dilakukan pada pH di atas 12,5, atau jika pH ekstrim dalam larutan, pasangan basa plasmid dapat lepas dan terjadi denaturasi, membentuk pDNA *single stranded*.

Setelah tahap lisis, larutan dinetralisasi dengan kalium asetat, yang mengendapkan SDS bersama-sama dengan gDNA terdenaturasi dan debris seluler. Pengerjaan berbeda dapat menghilangkan material tidak larut ini, sedangkan mayoritas pDNA tinggal dalam supernatan. Selama manipulasi, harus dijaga supaya tidak terjadi pemutusan gDNA membentuk fragmen-fragmen kecil yang tidak akan membentuk agregat. Hasil klarifikasi lisat alkali biasanya mengandung protein, RNA, lipopolisakarida (LPS), fragmen gDNA, dan kurang dari 1% (b/b) pDNA. Recovery dan pemurnian molekul pDNA dari lisat sel melibatkan beberapa teknik. Para ahli biologi molekuler mengembangkan metode skala lab dengan ultrasentrifugasi atau ekstraksi pelarut. Beberapa protokol biasa menggunakan reagen-reagen seperti fenol, ethidium bromida. Kelemahannya lagi, kapasitas yang terbatas, recovery rendah, dan biaya yang mahal.

III. BAHAN DAN METODA PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan lebih kurang selama enam bulan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi, Laboratorium Ekologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Jurusan Budi Daya Pertanian Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Mesin PCR (Eppendorf Mastercyclergradient[®]), wadah, kertas parafilm, tabung eppendorf, cawan petri, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, batang pengaduk, jarum ose, spatel, pipet mikro (Eppendorf[®]), pot salep, kertas perkamen, kapas steril, kasa steril, benang, selotip, lampu spritus, kapas lidi steril, jangka sorong, botol universal, pinset steril, *hot plate*, vortex (Mixer[®] VM-1000), timbangan digital, sentrifugator (Eppendorf Minispin[®]), inkubator (Gallenkamp[®]), lemari pendingin, *rotary shaker incubator* (Bigger Bill Digital[®]), *laminar air flow* (ESCO[®]), autoklaf, perangkat elektroforesa, alumunium foil, film Polaroid, UV transiluminator.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Udang putih, udang kelong, cumi-cumi, kepiting, media CHROMagar *Vibrio* (CHROMagarTM), CHROMagarTM O157, *Salt Polymixin Broth* (SPB), mEC Broth (Kyokuto[®]),

media Luria Burtani (LB) Broth, Luria Burtani Agar (LBA), aquadest steril, alkohol 70%, NaCl, 10xExtaq buffer, 5xcolorless buffer, 2,5 mM dNTPs (Deoksi Nukleotida Trifosfat), Primer, *Taq Polimerase*, DNA template, Gel Agarosa, media Mueller Hinton Agar (Merc[®]), disk antibakteri (BD BBL[™] Sensi Disc[™]) yaitu : Ampisilin (10 µg), gentamisin (10 µg), sulfametoksazol (25 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), eritromisin (15 µg), mineral oil, DNA ladder, blue dye solution, 1 x buffer TBE, ethidium bromida, GET buffer, NaOH, SDS 2 %, Kalium asetat 3 M, isopropanol, Kontrol positif *V. parahaemolyticus* yaitu : VP Strain AQ 4037 untuk gen *toxR*, VP Strain No.AQ 3815 untuk gen *tdh*, dan VP Strain No. AQ 4037 untuk gen *trh*. Kontrol positif *E.coli* O157 strain No. DL933 untuk gen *stx1*, dan strain No.T12 untuk gen *stx2*.

3.3. Metoda Penelitian

3.3.1. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas dibungkus dengan kertas perkamen, pipet mikro ditaruh dalam wadahnya, ditutup rapat dan diberi selotip, eppendorf dan kapas steril dimasukkan dalam bekerglas ditutup rapat dengan alumunium foil, lalu semua disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Jarum ose dan batang pengaduk disterilkan dengan cara diflambir diatas lampu spiritus selama 20 detik setiap kali akan digunakan.

3.3.2. Pembuatan Media

A. Media untuk bakteri *V. parahaemolyticus*

1. Pembuatan media Salt Polymixin Broth (SPB)

Sebanyak 33,0 g serbuk SPB dan NaCl 3% dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

2. Pembuatan media CHROMagar™ Vibrio

Sebanyak 74,7 g serbuk CHROMagar™ Vibrio dan NaCl 3% dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer steril, dipanaskan hingga terbentuk massa yang homogen, didihkan 1-2 menit, lalu dituang pada cawan petri sebanyak 15 ml tanpa sterilisasi.

3. Pembuatan media Luria Burtani (LB) Broth

Sebanyak 25 g serbuk LB broth dan NaCl 3% dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

4. Pembuatan media Luria Burtani Agar (LBA)

Sebanyak 37 g serbuk LBA dan NaCl 3% dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan sampai mendidih dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

B. Media untuk bakteri *E. coli* O157

1. Pembuatan media modified EC Broth (mEC Broth)

Sebanyak 36,6 g serbuk mEC Broth dilarutkan dalam 1000 ml aquadest steril di dalam erlenmeyer, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

2. Pembuatan media CHROMAgar™ O157

Sebanyak 29,2 g serbuk CHROMAgar™ O157 dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer steril, dipanaskan hingga terbentuk massa yang homogen, didihkan 1-2 menit, lalu dituang pada cawan petri sebanyak 15 ml tanpa sterilisasi.

3. Pembuatan media Luria Burtani (LB) Broth

Sebanyak 25 g serbuk LB broth dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

4. Pembuatan media Luria Burtani Agar (LBA)

Sebanyak 37 g serbuk LBA dilarutkan dalam 1 liter aquadest steril di dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan sampai mendidih dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15 menit.

3.3.3. Pengambilan sampel

Sampel diambil dari pedagang di daerah tepi laut Jalan Samudera mulai dari simpang Jl. Hangtuah sampai simpang Jl. Purus Padang dengan cara memasukkannya kedalam wadah, Kemudian diidentifikasi di Laboratorium

Ekologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

3.3.4 . Isolasi Bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157

A. *V. parahaemolyticus*

10 gram sampel yang telah dipotong-potong kecil dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan media SPB hingga 100 ml. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi kemudian dilakukan pengenceran mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-5} dengan cara memipet 0,1 ml sampel induk dimasukkan kedalam 0,9 ml media SPB dalam tabung eppendorf untuk pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya 0,1 ml dari pengenceran 10^{-1} dimasukkan kedalam tabung eppendorf untuk pengenceran 10^{-2} demikian seterusnya sampai pengenceran 10^{-5} . Setelah itu masing-masing pengenceran ditanam pada media CHROMAgarTM Vibrio dalam cawan petri. Lalu inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Biakan dalam cawan petri akan memberikan warna ungu yang menandakan adanya bakteri *V. parahaemolyticus*.

B. *E. coli* O157

10 gram sampel yang telah dipotong-potong kecil dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan media mEC Broth hingga 100 ml. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi kemudian dilakukan pengenceran mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-5} dengan cara memipet 0,1 ml sampel induk dimasukkan kedalam 0,9 ml media mEC Broth dalam tabung eppendorf untuk pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya 0,1 ml dari pengenceran 10^{-1} dimasukkan

kedalam tabung eppendorf untuk pengenceran 10^{-2} demikian seterusnya sampai pengenceran 10^{-5} . Setelah itu masing-masing pengenceran ditanam pada media CHROMAgar™ O157 dalam cawan petri. Lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Biakan dalam cawan petri akan memberikan warna ungu yang menandakan adanya bakteri *E. coli* O157.

3.3.5. Deteksi gen Bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157

3.3.5.1. Pembuatan *template* DNA Bakteri

Pembuatan *template* DNA Bakteri dilakukan dengan metode *Boil Cell Extraction* (BCE). Kultur bakteri dalam media LB Broth yang terdapat dalam tabung reaksi diambil sebanyak 1 ml dimasukkan dalam tabung eppendorf, lalu disentrifus pada 12.000 rpm selama 1 menit, cairan supernatan dibuang, endapan disuspensikan dalam 500 μl aquadest steril lalu divortex. Panaskan dalam air mendidih selama 10 menit. Selanjutnya diamkan selama 10 menit dalam lemari pendingin, lalu disentrifus pada 12.000 rpm selama 3 menit, supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru. Supernatan ini merupakan *template* DNA dan siap digunakan untuk deteksi gen menggunakan mesin PCR.

3.3.5.2. Deteksi gen-gen virulen

Untuk mendeteksi gen-gen virulen pada *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 dilakukan dengan metoda PCR. *Templat* DNA yang telah dibuat dimasukkan kedalam eppendorf khusus untuk mesin PCR dan ditambah komponen-komponen PCR sesuai dengan tabel I, II. Kemudian dilakukan amplifikasi DNA dengan program mesin PCR yang sesuai dengan tabel IV, V, VI.

Tabel I. Daftar komponen dan campuran pereaksi yang digunakan untuk gen *toxR*

Pereaksi	Jumlah Pereaksi (μl)
10 x Extaq buffer	2,5
2,5 mM dNTP solution	2,0
Primer 1 (10 μM <i>toxR</i> 4)	1,0
Primer 2 (10 μM <i>toxR</i> 7)	1,0
DW	17,4
<i>Go Taq DNA Polymerase</i>	0,1
<i>DNA Template</i>	1,0

Tabel II. Daftar komponen dan campuran pereaksi yang digunakan untuk gen *tdh*, *trh*, *stx1* dan *stx2*

Pereaksi	Jumlah Pereaksi (μl)
5 x colorless buffer	5,0
2,5 mM dNTP solution	2,0
Primer 1	1,0
Primer 2	1,0
DW	15,0
<i>Go Taq DNA Polymerase</i>	0,1
<i>DNA Template</i>	1,0

Tabel III. Program kerja mesin PCR untuk deteksi gen *toxR* (23 siklus):

Tahapan Dalam Siklus	Temperatur / Waktu
Predenaturasi	96 ⁰ C (5 menit)
Denaturasi	94 ⁰ C (1 menit)
Annealing (Pengikatan)	63 ⁰ C (1,5 menit)
Extension (Pemanjangan)	72 ⁰ C (1,5 menit)
Elongation (Pemanjangan akhir)	72 ⁰ C (7 menit)

Tabel IV. Program mesin PCR untuk gen *tdh* dan *trh* (33 siklus):

Tahapan Dalam Siklus	Temperatur / Waktu
Predenaturasi	96 ⁰ C (5 menit)
Denaturasi	94 ⁰ C (1 menit)
Annealing (Pengikatan)	55 ⁰ C (1 menit)
Extension (Pemanjangan)	72 ⁰ C (1 menit)
Elongation (Pemanjangan akhir)	72 ⁰ C (7 menit)

Tabel V. Program mesin PCR untuk gen *stx1* dan *stx2* (33 siklus):

Tahapan Dalam Siklus	Temperatur / Waktu
Predenaturasi	94 ⁰ C (1 menit)
Denaturasi	94 ⁰ C (1 menit)
Annealing (Pengikatan)	55 ⁰ C (1,5 menit)
Extension (Pemanjangan)	72 ⁰ C (1,5 menit)
Elongation (Pemanjangan akhir)	72 ⁰ C (7 menit)

Setelah semua tahapan pada mesin PCR dilakukan kemudian hasil amplifikasi PCR dicampurkan dengan *blue dye solution* di atas kertas parafilm, lalu dimasukkan dalam sumur gel agarose. Elektroforesa dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 1 % menggunakan TBE 1 x pada tegangan 100 Volt selama 20 menit. Selanjutnya gel diwarnai dengan 0,5 µl/ml larutan ethidium bromida selama 5-10 menit dan di cuci dengan aquadest selama 3 menit kemudian hasil elektroforesa di amati dengan transiluminator UV. Gel tersebut difoto dengan menggunakan film Polaroid. Pada foto dapat dilihat pola pemisahan pita-pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran fragmen DNA standar 100 bp DNA *ladder* (tabel VI) yaitu ukuran amplifikasi *toxR* 368 bp, *tdh* 251 bp, *trh* 250 bp, *stx1* 349 bp dan *stx2* 404 bp.

Tabel VI. Primer spesifik untuk deteksi gen *toxR*, *tdh*, *trh*, *stx1* dan *stx2*

Primer	Oligonukleotida sequence (5'–3')	Target gen	Ukuran amplifikasi product (base pairs)
<i>toxR</i> 4 <i>toxR</i> 7	GTCTTCTGACGCAATCGTTG ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	<i>toxR</i>	368
<i>tdh</i> -D3 =VPD2 <i>tdh</i> -D5 =VPD1	CCACTACCACTCTCATATGC GGTACTAAATGGCTGACATC	<i>tdh</i>	251
<i>trh</i> -R2 <i>trh</i> -R6	GGCTCAAAATGGTTAAGCG CATTCCGCTCTCATATGC	<i>trh</i>	250
<i>EVT</i> -1 <i>EVT</i> -2	CAACACTGGATGATCTCAG CCCCCTCAACTGCTAATA	<i>stx1</i>	349
<i>EVS</i> -1 <i>EVS</i> -2	ATCAGTCGTCACCTACTGGT CCAGTTATCTGACATTCTG	<i>stx2</i>	404

3.3.6. Uji Resistensi isolat *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 terhadap Beberapa Antibiotika

Biakan murni *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 yang telah diremajakan dalam LB broth diambil dengan kapas lidi steril dan dioleskan pada media Mueller Hinton Agar secara merata pada permukaan media. Disk antibiotika diletakkan hati-hati diatas biakan bakteri dengan menggunakan pinset steril. Jarak disk dengan tepi cawan petri 15 mm dan jarak antar disk 24 mm. Biakan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Daerah hambatan yang terlihat sebagai wilayah bening disekitar disk antibiotik diukur diameternya dan karakter resistensi dari bakteri tersebut terhadap antibiotika di karakterisasi menurut tabel standar yang ditetapkan oleh produsen disk antibiotika.

Tabel VII : Standar Diameter Daerah Hambat Antibiotika.

No	Antibiotika	Diameter Daerah Hambat (mm)		
		Resisten	intermediet	sensitif
1	Ampisilin	13	14 – 16	17
2	Kloramfenikol	12	13 - 17	18
3	Eritromisin	13	14 - 22	23
4	Gentamisin	12	13 - 14	15
5	Sulfametoksazol	10	11 – 15	16
6	Tetrasiklin	14	15 -19	20

Sumber : BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs; Approved Standard, 2007

3.3.7. Deteksi plasmid *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157

Untuk mendeteksi plasmid pada bakteri tersebut, terlebih dahulu dilakukan isolasi plasmid dengan metoda ekstraksi alkalis (Sambrook, et al, 1989; Birnboim, 1979). Biakan bakteri yang ada didalam LB broth diambil 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian sel-sel dijadikan pellet dengan

sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit, buang supernatan. Pellet-pellet sel yang dihasilkan disuspensikan kembali dalam 150 μ l GET buffer (pH=8) dan di vorteks kemudian ditambahkan 175 μ l SDS 2 % dan 175 μ l NaOH 0,4 N, didiamkan 10 menit pada suhu -20°C . Selanjutnya ditambahkan 250 μ l kalium asetat 3 M (pH=4,8) lalu dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit dan kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan, dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru yang steril dan ditambahkan 750 μ l isopropanol dingin, lalu disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat dibuang sedangkan endapan yang merupakan pellet DNA plasmid dibiarkan mongering selama 30 menit kemudian disuspensikan kembali dalam 40 μ l aquadest.

Untuk mendeteksi keberadaan plasmid dilanjutkan dengan elektroforesis yaitu menggunakan gel agarose 0,8% dengan tegangan 90 Volt selama 1 jam. Setelah dielektroforesis, gel agarosa direndam selama 5-10 menit dan larutan ethidium bromide. Kemudian dilakukan pencucian larutan pewarna dalam air suling selama 3 menit. Selanjutnya diamati dengan UV transiluminator. Ukuran plasmid diestimasi melalui perbandingan dengan *ladder* 1 kb.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Hasil isolasi menunjukkan bahwa pada sampel makanan laut (Udang kelong, udang putih, cumi-cumi dan kepiting) yang diambil pada daerah tepi laut laut Jalan Samudra Kota Padang, didapatkan 115 isolat yang diduga *V. parahaemolyticus* yang memperlihatkan adanya koloni berwarna ungu pada media CHROMagarTM*Vibrio* yang merupakan media spesifik untuk pertumbuhan *V. parahaemolyticus* (Lampiran 3, gambar 8) yang kemudian dilanjutkan konfirmasi keberadaan *V. parahaemolyticus* dengan mendeteksi gen *toxR* menggunakan metoda PCR, hasil memperlihatkan bahwa terdapat 86 isolat positif (74,78%) terdeteksi mengandung gen *toxR*. Dari 86 isolat positif *toxR* selanjutnya dilakukan deteksi gen *tdh* dan *trh*, hasil yang didapatkan 8 isolat positif (9,30%) yang mengandung gen *tdh* dan 5 isolat positif (5,81%) yang mengandung *trh* seperti yang terlihat pada lampiran 4, tabel VIII, IX.
2. Sedangkan pada bakteri *E. coli* O157 didapatkan 81 isolat yaitu 20 isolat udang kelong, udang putih dan cumi-cumi serta 21 isolat pada kepiting yang memperlihatkan koloni warna ungu pada media CHROMagarTMO157 yang merupakan media spesifik untuk pertumbuhan *E.coli* O157 (lampiran 3, gambar 9), yang kemudian dilanjutkan dengan mendeteksi gen *stx1* dan *stx2* bakteri *E. coli* O157 dan hasil yang didapatkan bahwa terdapat 19 isolat positif (23,45%) memiliki gen *stx1*; 26 isolat positif (32,09%) yang mengandung gen *stx2*, 5 isolat positif (6,17%) yang mengandung gen *stx1* dan *stx2*, dan 41

isolat (50,61%) negatif gen *stx1* dan *stx2*, seperti terlihat pada lampiran 5, tabel XIII, XIV.

3. Hasil uji resistensi 86 isolat *V. parahaemolyticus* terhadap 6 jenis antibiotika menunjukkan 67 isolat (77,90%) resisten terhadap ampisilin, 21 isolat (24,44%) resisten terhadap kloramfenikol, 38 isolat (44,18%) resisten terhadap eritromisin, 27 isolat (31,39%) resisten terhadap gentamisin, 80 isolat (93,02%) resisten terhadap sulfametoksazol, 25 isolat (29,06%) resisten terhadap tetrasiklin, seperti yang terlihat pada lampiran 4, tabel X, XII. Dari hasil uji resistensi antibiotika tersebut dapat direkapitulasi isolat *V. parahaemolyticus* yang resisten terhadap satu antibiotika 3 isolat (3,49%), dua antibiotika 28 isolat (32,56%), tiga antibiotika 33 isolat (38,37%), empat antibiotika 12 isolat (13,95%), lima antibiotika 8 isolat (9,30%), enam antibiotika 2 isolat (2,33%), seperti yang terlihat pada lampiran 4 tabel XI .
4. Hasil uji resistensi 40 isolat murni *E. coli* O157 terhadap 6 jenis antibiotika menunjukkan 31 isolat (77,5%) resisten terhadap ampisilin, 22 isolat (55%) resisten terhadap kloramfenikol, 10 isolat (25%) resisten terhadap eritromisin, 24 isolat (60%) resisten terhadap gentamisin, 30 isolat (75%) resisten terhadap sulfametoksazol, 15 isolat (37,5%) resisten terhadap tetrasiklin, seperti yang terlihat pada lampiran 8, tabel XV, XVII. Dari semua isolat tersebut yang resisten pada satu antibiotika adalah 3 isolat (7,5%), dua antibiotika adalah 8 isolat (20%), tiga antibiotika adalah 15 isolat (37,5%), empat antibiotika adalah 5 isolat (12,5%), lima antibiotika adalah 6 isolat (15%), enam antibiotika adalah 3 isolat (7,5%), seperti yang terlihat pada lampiran 5, tabel XVI.

5. Dari 86 isolat *V. parahaemolyticus* yang resisten dilanjutkan dengan plasmid, didapatkan 32 pola resistensi antibiotika dan dideteksi keberadaan plasmid pada 19 isolat yang memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp seperti yang terlihat pada lampiran 4, tabel VIII.
6. 40 isolat *E. coli* O157 dilakukan isolasi plasmid, didapatkan 24 pola resistensi antibiotika dan dideteksi keberadaan plasmid pada 12 isolat memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp seperti yang terlihat pada lampiran 5, tabel XIII.

4.2. Pembahasan

Dari total 13 sampel yang dilakukan pengisolasian bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu 3 sampel udang kelong, 3 sampel udang putih, 4 sampel cumi-cumi dan 3 sampel kepiting maka didapatkan 115 isolat yang diduga adanya *V. parahaemolyticus* yang di tandai adanya koloni tunggal berwarna ungu pada media CHROMAgarTM*Vibrio*. Ketika sampel di streak pada CHROMAgarTM*Vibrio*, ada tiga koloni yang diamati yaitu warna ungu (*V. parahaemolyticus*), hijau-biru (*V. vulnificus/V.cholera*) dan putih (*V. alginolyticus*). Hasil 3 jenis vibrio yaitu *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* dan *V. cholerae* ini biasanya selalu ada dan terkait dengan *V. parahaemolyticus* di lingkungan perairan dan makanan laut. Pemilihan isolat berdasarkan koloni yang kuat muncul dengan murni warna ungu pada CHROMAgarTM*Vibrio* (Hara-Kudo *et al.*, 2003). Dari 4 sampel yang telah diuji pada CHROMAgarTM*Vibrio* dilanjutkan dengan deteksi gen *toxR* untuk mengkonfirmasi adanya *V. parahaemolyticus* menggunakan metoda PCR. Hasil pengujian tersebut

didapatkan 86 isolat positif (74,78%) *V. parahaemolyticus*. Menurut Linda, *et al* 2006 melaporkan bahwa > 70% dari makanan laut menunjukkan adanya *V. parahaemolyticus*. Mengidentifikasi *V. parahaemolyticus* melalui metoda PCR lebih efisien, handal dan spesifik dibandingkan dengan uji biokimia (Kim *et al.*, 1999; Dileep *et al.*, 2003)).

Penelitian sebelumnya, Rojlorsakul *et al* (1998) telah berhasil mendeteksi 75 strain *V. parahaemolyticus* dari 91 strain (82,42%) yang diuji terhadap sampel *seafood* dengan metoda PCR, sedangkan hasil penelitian kali ini menunjukkan hasil persentase yang tidak jauh seperti yang didapatkan oleh Rojlorsakul *et al* (1998). Marlina (2008) juga berhasil mendeteksi gen *toxR* sekitar 57,14% untuk mengkonfirmasi adanya *V. parahaemolyticus* pada sampel air laut dari pantai jambak dan Bungus Kota Padang, sedangkan di perairan pesisir barat Amerika Serikat (Okuda *et al.*, 1997), tiram dan sedimen pesisir Washington (Depaola *et al*, 2003) juga berhasil diisolasi adanya *V. parahaemolyticus*. Fragmen gen *toxR* (368 bp) adalah spesifik untuk *V. parahaemolyticus* yang berhasil diamplifikasi dari semua isolat. Dalam penelitian ini, *primer* digunakan untuk amplifikasi gen *toxR* yang spesifik dan sebagai kontrol positif *V. parahaemolyticus* digunakan isolat AQ 4037. Hasil ini sesuai dengan peneliti lain yang melaporkan bahwa gen ini hadir dalam semua isolat *V. parahaemolyticus* (Kim *et al.*, 1999; Dileep *et al.*, 2003; Sujeewa *et al.*, 2009). Ukuran gen *toxR* adalah 368 bp dan pertama kali ditemukan sebagai gen pengaturan dari operon toksin, tetapi kemudian terbukti terlibat dalam regulasi banyak gen (Miller *et al.*, 1987; DiRita *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999). Deteksi gen virulens pada *V. parahaemolyticus* hanya untuk penentuan isolat patogen sedangkan gen *toxR*

dapat digunakan untuk menentukan semua baik isolat patogen atau non-patogenik dan juga berfungsi sebagai regulator untuk ekspresi gen faktor virulensi pada *V. parahaemolyticus* (Sechi *et al.*, 2000).

Bakteri *V. parahaemolyticus* berdasarkan kemampuannya menghemolisa sel darah merah dapat dibedakan atas *V. parahaemolyticus* kanagawa positif dan *V. parahaemolyticus* kanagawa negatif (Wong, 1999). Hemolisin yang telah diisolasi dari *V. parahaemolyticus* yaitu TDH (*thermostable direct hemolysine*), dan TRH (*thermostable direct hemolysine-related hemolysine*). Kedua hemolisin ini merupakan faktor virulen penting yang terdapat pada *V. parahaemolyticus* (Wong, 1999). Dari hasil 86 isolat yang positif memiliki gen *toxR* dilanjutkan mendeteksi gen *tdh* dan *trh*. Kedua gen yang terdapat pada *V. parahaemolyticus* ini berperan dalam sintesa enterotoksin TDH dan TRH yang dapat menyebabkan peningkatan sekresi cairan intestinal (Kim, *et al.* 1999). Dengan menggunakan *primer-primer* yang spesifik, kedua gen ini dapat dideteksi dengan menggunakan metoda PCR untuk melihat patogenitas dari *V. parahaemolyticus*. Gen virulen yang mengkode dihasilkannya toksin TDH adalah gen *tdh* atau *thermostable direct hemolysin* dan toksin TRH adalah gen *trh* atau *TDH-related hemolysin* (Shirai *et al.*, 1990). Jumlah sekuen pada kedua gen ini lebih kurang 165 asam amino. Gen *tdh* dan *trh* hanya terdapat pada bakteri *V. parahaemolyticus* yang bersifat toksik saja. Sedangkan *V. parahaemolyticus* yang tidak mengandung kedua gen tersebut, tergolong kepada bakteri yang tidak toksik (Sujeewa *et al.*, 2009). TDH merupakan protein yang bersifat toksin enteropatogenik yang bertanggung jawab terhadap terjadinya fenomena *Kanagawa* positif dan merupakan faktor penentu yang penting terhadap virulensi

bakteri *V. parahaemolyticus* (Okuda *et al.*, 1997). TDH mengakibatkan efek sitotoksik, lisis terhadap eritrosit, kekacauan terhadap mikrotubula sitokleton dan masuknya ion ke dalam sel (Lynch *et al.*, 2004). TDH dapat dinaktifkan pada suhu 100°C selama 10 menit dan aktivitas hemolisis tidak diperkuat dengan penambahan lesitin (Nishibuchi *et al.*, 2004). Urutan asam amino gen *trh* 68,6 % identik dengan gen *tdh*. Diperkirakan kedua gen ini berasal dari rantai yang sama pada awalnya (Shirei *et al.*, 1990). Terjadinya perbedaan diperkirakan karena adanya transfer genetik dan insersi pada rantai basa nukleotida (Nishibuchi *et al.*, 2004). Toksin TRH memiliki efek biologi yang juga hampir sama yaitu sitotoksis, aktivitas hemolitik, kardiotoxikitas, dan enterotoksisitas (Iida *et al.*, 1998). TRH bertanggung jawab terhadap terjadinya fenomena *Kanagawa* negatif. Akan tetapi, pemurnian TDH dan TRH tidak memiliki kemampuan yang cukup kuat untuk menyebabkan gastroenteritis. Maka perlu dilihat faktor lain yang berkontribusi untuk terjadinya patogenitas pada bakteri ini (Iida *et al.*, 1998).

Maka isolat yang positif terdeteksi adanya *toxR* dilanjutkan dengan mendeteksi gen *tdh* dan *trh* dengan metoda PCR.. Deteksi untuk fragmen gen *tdh* dan *trh* dalam isolat dari 86 isolat menunjukkan hasil 8 isolat (9,3%) positif pada gen *tdh* dan 5 isolat (5,81%) yang positif gen *trh*. Kedua gen dengan ukuran 251 bp (gen *tdh*) dan 250 bp (gen *trh*) muncul pada gel agarose sedangkan gen ini juga muncul pada kontrol positif isolat *V. parahaemolyticus* No.AQ 3815 untuk gen *tdh*, dan VP Isolat No. AQ 4037 untuk gen *trh*. Pada penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya di berbagai negara, persentase gen *tdh* pada sampel klinik lebih banyak dibandingkan gen *trh* sampel yang diambil dari lingkungan (Sujeewa *et al.*, 2009; Iida *et al.*, 1998). Sebaliknya, gen *trh* lebih banyak dari

pada gen *tdh* pada sampel lingkungan dan hasil laut (Shirei *et al.*, 1990). Namun dari hasil penelitian ini gen *tdh* lebih banyak terdapat pada sampel lingkungan. Hal ini diduga disebabkan oleh penyebaran isolat yang bersifat patogen bakteri *V. parahaemolyticus* itu sendiri dari sampel klinik seperti feses ke sampel lingkungan seperti air laut dan makanan yang diproduksi dari hasil laut. Dari hasil yang diperoleh yaitu 8 isolat (9,30%) positif memiliki gen *tdh* yaitu terdapat pada sampel udang kelong dengan nomor isolat 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11 dan 5 isolat (5,81%) yang memiliki gen *trh* yang terdapat 4 isolat pada Udang putih dengan nomor isolat 25, 28, 29, dan 30 dan 1 isolat pada cumi-cumi pada isolat nomor 52, artinya, hasil ini memperlihatkan bahwa bakteri *V. parahaemolyticus* bersifat patogenik terhadap sampel makanan laut yang telah di uji pada penelitian ini, memiliki risiko yang cukup membahayakan terhadap kesehatan manusia. Hara kudo (2003) juga berhasil mendeteksi adanya gen *tdh* 10% pada makanan laut. Deteksi gen *trh* and *tdh* adalah penting untuk mempelajari distribusi bakteri patogen terutama yang berasal dari laut. Sebagian besar hasil laut dari daerah tropis terutama Asia Tenggara dikenal memiliki risiko tinggi *V. parahaemolyticus* yaitu antara 20-70% (Wong *et al.* , 1999; Ronald and Santos, 2001). Hal ini karena tingginya temperature laut 25-35°C, dengan demikian kejadian dan distribusi dari *V. parahaemolyticus* adalah sepanjang tahun. Air laut adalah faktor kontribusi besar untuk terjadinya persentase tinggi *V. parahaemolyticus* di sampel makanan laut. Meskipun *V. parahaemolyticus* secara luas didistribusikan dalam lingkungan dan makanan laut seluruh dunia dan sebagian besar dari mereka tidak patogen untuk manusia, konsumen masih perlu untuk meningkatkan kesadaran mereka dan memastikan bahwa makanan laut dimasak dengan benar. Pencegahan

infeksi tergantung pada penanganan dari makanan laut mentah dan persiapan selesai makanan untuk mengurangi atau menghilangkan bahaya terjadinya keracunan makanan.

Peningkatan masalah resistensi antibiotika dapat membatasi pilihan terapi saat ini. Hal ini sangat mengkhawatirkan dan diketahui adanya plasmid pada bakteri yang resisten terhadap antibiotika. Bahkan di negara tetangga, ada laporan multiresisten obat lainnya bakteri patogen terisolasi dari makanan mentah (Robin *et al.*, 2007; Chai *et al.*, 2008). Dengan demikian, makanan yang terkontaminasi dengan bakteri tersebut adalah ancaman bagi kesehatan masyarakat akibat determinan resistensi antibiotika yang dapat dikirim ke bakteri lain. Dalam penelitian ini, dilakukan uji resistensi antibiotika dari 86 isolat terhadap 6 jenis antibiotika, yaitu: ampisilin (10µg), kloramfenikol (30µg), eritromisin (15µg), gentamisin (10µg), sulfametoksazol (25µg), dan tetrasiklin (30µg). Uji resistensi antibiotika dilakukan dengan metoda difusi agar dan hasilnya diinterpretasikan menurut tabel yang direkomendasikan oleh BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs; Approved Standard, 2007". Dari 86 isolat *V. parahaemolyticus* yang dilakukan uji resistensi antibiotika, maka didapatkan hasil 3 isolat (3,49%) yang resisten pada satu antibiotika, dua antibiotika 28 isolat (32,56%), tiga antibiotika 33 isolat (38,37%), empat antibiotika 12 isolat (13,95%), lima antibiotika 8 isolat (9,30%), enam antibiotika 2 isolat (2,32%). Berdasarkan persentase antibiotika yang digunakan dalam pengujian ini maka antibiotika yang persentase lebih besar secara berurutan adalah sulfametoksazol 93,02%, ampisilin 77,90%, eritromisin 44,18%, gentamisin 31,39%, tetrasiklin 29,06%, dan kloramfenikol 24,41%. Dari

keseluruhan isolat yang diuji lebih dari 50% dari isolat, yang resisten terhadap sulfametoksazol dan ampisilin. Namun, Ottaviani *et al.* (2001) juga menunjukkan bahwa *V. parahaemolyticus* resisten terhadap ampisilin. Selain itu juga Tanil *et al.* (2005) juga menunjukkan 95,2% resisten terhadap ampisilin, tetrasiklin 14,3% dan gentamisin 9,5%, hal yang sama juga didapatkan oleh Wong, *et al.*, 1999. Hasil pengujian juga dipengaruhi dari konsentrasi garam yang menyebabkan perubahan sensitivitas terhadap antibiotika. Menurut Karlowsky *et al.* (2003) menunjukkan bahwa lokasi geografis mempengaruhi tingkat resistensi antibiotika. Penelitian lain yang dilaporkan oleh Li *et al.*, (1998) menunjukkan bahwa tetrasiklin masih aktif terhadap *Vibrio* spp. Hasil ini juga mirip dengan French *et al.* (1989) yang melaporkan kesensitivitas antibiotika untuk *V. parahaemolyticus*. Studi mereka, sebagian besar isolat resisten terhadap ampisilin tapi kebanyakan rentan terhadap kloramfenikol dan tetrasiklin.

Dari isolat *V. parahaemolyticus* yang telah dilakukan uji resistensi maka dilanjutkan pendeteksian plasmid yang terlebih dahulu dilakukan isolasi plasmid, Metoda ini terdiri atas dua tahap utama yaitu pendestruksian dinding sel bakteri dengan menggunakan GET buffer dan SDS 2 %. GET buffer akan menguraikan lapisan peptida pada dinding sel, sedangkan SDS 2 % ditambahkan untuk mendenaturasi lapisan protein pada dinding sel. Karena pendestruksiannya hanya berlangsung dalam suasana alkalis maka ditambahkan NaOH 0,4 N untuk mencapai suasana alkalis. Tahap selanjutnya yaitu pemisahan plasmid dari DNA kromosom dan protein-protein sel dengan menambahkan Kalium Asetat sehingga protein-protein dengan berat molekul besar akan mengendap. Selanjutnya sisa-sisa protein lain dicuci dengan isopropanol dan etanol sehingga diperoleh plasmid

yang bebas dari protein pengganggu. Selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 0,8%, maka pola pemisahan pita plasmid dapat dideteksi dengan menggunakan UV transiluminator. Hasil yang didapatkan yaitu diketahuinya keberadaan plasmid pada 19 isolat yang memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp dan sisanya tidak menunjukkan keberadaan plasmid. Plasmid yang terdeteksi terdapat pada isolat yang resisten pada 2 antibiotika yaitu AmpSul (No. isolat 17, 29, 34, 56 dan 62), EriSul (No. isolat 25), SulTet (No. isolat 9); isolat yang resisten pada 3 antibiotika yaitu AmpEriSul (No. isolat 3, 48, 82), AmpSulTet (No. isolat 41), AmGenSul (No. Isolat 79, 19), AmpKloSul (No. isolat 27), AmpEriSul (No. isolat 13, 61), KloEriSul (No. Isolat 68); isolat yang resisten pada 4 antibiotika yaitu AmpKloGenSul (No. isolat 11) dan AmpEriGenTet (No. Isolat 67). Jadi isolat yang paling banyak mengandung plasmid terdapat pada pola resistensi AmpSul yaitu sebanyak 5 isolat, dan antibiotika yang paling banyak ada terdeteksi adanya plasmid adalah Sulfametoksazol dan diikuti dengan antibiotika ampicilin. Dalam studi ini, profil plasmid adalah 19 isolat yang terdeteksi yang menunjukkan bahwa profil plasmid tersebut dapat digunakan sebagai gambaran dalam epidemiologi typing *V. parahaemolyticus* seperti yang dijelaskan oleh Meyer (1988). Dalam studi ini, hasil tidak dapat menghubungkan resistensi antibiotika antara *V. parahaemolyticus* dengan deteksi plasmid karena tidak ada studi transfer genetik dilakukan. Peran plasmid dalam beberapa resistensi antibiotika masih harus diselidiki lebih lanjut.

Dalam penelitian ini juga dilakukan hal yang sama terhadap bakteri *E. coli* O157 dan didapatkan 81 isolat dari empat sampel makanan laut yang diisolasi

yaitu 20 isolat Udang kelong, 20 isolat udang putih, 20 isolat cumi-cumi dan 21 isolat kepiting, koloni tunggal berwarna ungu yang didapatkan pada media CHROMagar™O157 yang merupakan media selektif untuk *E.coli* O157, yang memberikan warna ungu pada bakteri *E.coli* O157 dan warna biru pada *E.coli*. Shiga-like toxin *E.coli* (STEC) diketahui penyebab penyakit yang serius pada manusia dan menjadi perhatian pada kesehatan masyarakat (Paton dan Paton 1998). Infeksi akibat STEC dapat mengakibatkan diare berdarah (haemorrhagic colitis, HC) yang dapat berkembang menuju *hemolitik-uraemic syndrome* (HUS). *E.coli* O157 pertama kali diakui sebagai patogen manusia pada tahun 1982, dan dikaitkan dengan dua wabah akibat konsumsi hamburger yang terkontaminasi di Amerika Serikat (Riley *et al.* 1983). Infeksi manusia dilaporkan dari 30 negara di enam benua (Mead dan Griffin 1998) dan hasil terutama dari makan mentah atau kurang matang, makanan terkontaminasi. Faktor virulens utama STEC adalah diproduksi satu atau lebih Shiga toxin (STX), yaitu *Stx1* dan *Stx2* (O'Brien *et al.* 1984). Titik asal dari STEC adalah ruminansia seperti domba, kambing, dan khususnya, bovines (Zschock *et al.* 2000; Hancock *et al.* 2001). hewan lain seperti babi dan anjing juga mengandung isolat STEC (Beutin *et al.* 1993; Bouvet *et al.* 2001) yang dapat mengkontaminasi makanan atau bahan lainnya. Sumber lain isolat STEC lingkungan adalah pembuangan limbah dan STEC termasuk *E.coli* O157 diisolasi dari limbah (Höller *et al.* 1999; Vernozy-Rozand *et al.* 2002).

Pencemaran lingkungan melalui sumber-sumber ini menandakan risiko bagi kesehatan manusia karena infeksi STEC melalui konsumsi air yang terkontaminasi (Ackman *et al.* 1997; Olsen *et al.* 2002). Lingkungan pesisir adalah wadah dari air limbah dan STEC kemungkinan ada di daerah pesisir yang

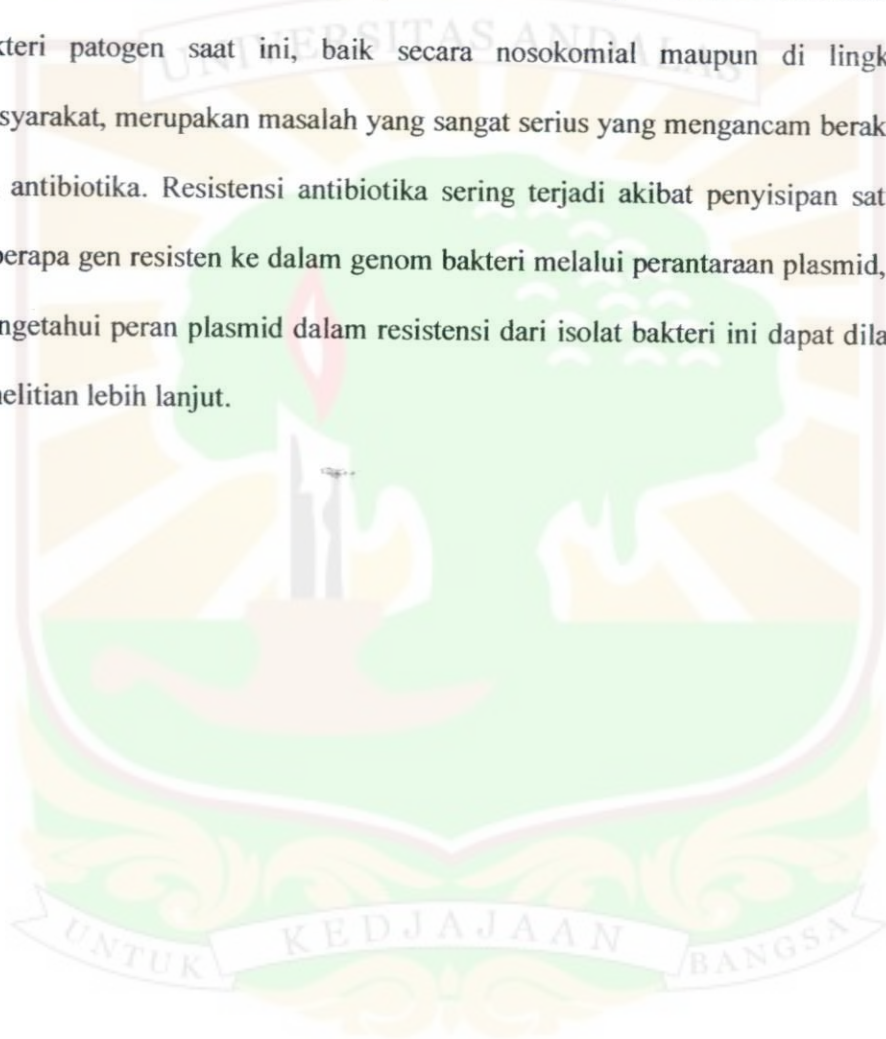
sangat terbuka, karena filter-kegiatan mereka makan, hewan laut bisa berkonsentrasi dan mempertahankan kehadiran mikroba patogen di perairan lingkungan tersebut. Selain itu, keberadaan *E. coli* O157 dapat juga disebabkan oleh kontaminasi silang dari penggunaan air yang digunakan dalam pencucian. Hal ini mungkin saja terjadi pada sampel yang telah diisolasi *E. coli* O157 dan didapatkan 81 isolat *E. coli* O157 yaitu 19 isolat (23,45%) positif memiliki gen *stx1* dan 26 isolat (32,09%) positif memiliki gen *stx2*, 5 isolat (6,17%) yang memiliki kedua gen *stx1* dan *stx2*, dan 41 isolat (50,61%) yang negatif memiliki gen *stx1* dan *stx2*, hasil ini menunjukkan sampel terkontaminasi bakteri *E. coli* O157 yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia seperti diare berdarah, infeksi saluran cerna (*Haemorrhagic Colitis*) dan infeksi saluran kencing (*Haemolytic Uremic Syndrome*), karena kedua gen inilah yang bersifat patogen pada bakteri *E. coli* O157. Gourmelon *et al* (2006) pernah berhasil mendeteksi shiga toxin menggunakan metoda PCR pada produk laut yang diambil didaerah pesisir. Faktor virulensi utama STEC adalah produksi satu atau lebih racun Shiga (STX).

Pengembangan resistensi antibiotika antara isolat bakteri harus dipantau. Rencana untuk pengembangan terapi antibiotika harus dilaksanakan terus-menerus untuk mengembangkan agen baru yang efektif untuk melawan bakteri yang resisten. Semakin tinggi penggunaan antibiotika, semakin tinggi pula tekanan selektif proses evaluasi dan proliferasi strain mikroorganisme yang bersifat resisten. Untuk itu dilakukan uji resistensi antibiotika terhadap isolat *E. coli* O157. Hasil menunjukkan bahwa dari 40 isolat *E. coli* O157 didapatkan 31 isolat (77,5%) resisten terhadap ampicilin, 22 isolat (55%) resisten terhadap

kloramfenikol, 10 isolat (25%) resisten terhadap eritromisin, 24 isolat (60%) resisten terhadap gentamisin, 30 isolat (75%) resisten terhadap sulfametoksazol, 15 isolat (37,5%) resisten terhadap tetrasiklin, dari semua isolat tersebut yang resisten pada satu antibiotika adalah 3 isolat (7,5%), dua antibiotika adalah 8 isolat (20%), tiga antibiotika adalah 15 isolat (37,5%), empat antibiotika adalah 5 isolat (12,5%), lima antibiotika adalah 6 isolat (15%), enam antibiotika adalah 3 isolat (7,5%), lebih dari 70% isolat yang resisten terhadap ampicilin dan sulfametoksazol; berarti lebih dari 50% isolat yang resisten terhadap kloramfenikol dan gentamisin. Sebelumnya penelitian telah menunjukkan bahwa resisten terhadap sulfametoksazol

Dari semua isolat tersebut yang resisten pada satu antibiotika adalah 3 isolat (7,5%), dua antibiotika adalah 8 isolat (20%), tiga antibiotika adalah 15 isolat (37,5%), empat antibiotika adalah 5 isolat (12,5%), lima antibiotika adalah 6 isolat (15%), enam antibiotika adalah 3 isolat (7,5%) . Hal yang sama juga dilakukan deteksi plasmid pada isolat *E.coli* O157 dengan metoda yang sama dengan *V. parahaemolyticus*. Hasil penelitian didapatkan 12 isolat pada *E. coli* O157 yang terdeteksi adanya plasmid dengan ukuran > 10.000 bp dan didapatkan 24 pola resistensi antibiotika. Isolat yang terdeteksi plasmid maka pola resistensi terlihat pada 2 antibiotika yaitu AmpSul (No. isolat 44); isolat yang resisten pada 3 antibiotika yaitu AmpGenSul (No. Isolat 13, 55), AmpKloSul (No. isolat 28), AmpSulTet (No. isolat 8), AmpKloEri (No. isolat 12), GenSulTet (No. isolat 78), KloSulTet (No. isolat 17); isolat yang resisten pada 4 antibiotika yaitu AmpKloGenSul (No. isolat 15, 80) dan isolat yang resisten pada 5 antibiotika yaitu AmpKloGenSulTet (No. isolat 57), AmpKloEriGenSul (No. isolat 62). Isolat yang

paling banyak terdeteksi adanya plasmid adalah 2 isolat yang terdapat pada pola resistensi AmpGenSul dan AmpKloGenSul, sedangkan antibiotika yang paling banyak adanya plasmid adalah sulfametoksazol yang diikuti dengan antibiotika ampicilin dan antibiotika yang paling sedikit terdeteksi adalah eritromisin. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa isolat yang diuji menunjukkan sifat resistensi terhadap sejumlah antibiotika yang berbeda. Timbulnya resistensi antibiotika pada bakteri patogen saat ini, baik secara nosokomial maupun di lingkungan masyarakat, merupakan masalah yang sangat serius yang mengancam berakhirnya era antibiotika. Resistensi antibiotika sering terjadi akibat penyisipan satu atau beberapa gen resisten ke dalam genom bakteri melalui perantaraan plasmid, untuk mengetahui peran plasmid dalam resistensi dari isolat bakteri ini dapat dilakukan penelitian lebih lanjut.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. udang putih (*Penaeus mergensis*), udang kelong (*Penaeus indicus*), cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) dan kepiting (*Scylla serrata*) yang dijual di daerah tepi laut pantai Padang terkontaminasi oleh bakteri *V. parahaemolyticus* yang bersifat patogen. Gen *tdh* yang terdapat pada sampel memiliki persentase lebih besar dibandingkan gen *trh*. Sedangkan bakteri *E.coli* O157 terdapat 19 isolat positif memiliki gen *stx1*, dan 26 isolat positif yang mengandung gen *stx2*
2. Pola resistensi antibiotik pada bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E.coli* O157 menunjukkan tingginya tingkat resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik yang diuji. Dari 86 isolat *V. parahaemolyticus* didapatkan 32 pola resistensi antibiotika dan dideteksi keberadaan plasmid pada 19 isolat yang memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp dan 40 isolat *E. coli* O157 didapatkan 24 pola resistensi antibiotika dan dideteksi keberadaan plasmid pada 12 isolat memiliki ukuran plasmid yang besar dari 10.000 bp

5.2. Saran

Disarankan kepada peneliti untuk mengkarakterisasi dengan beberapa teknik molekul terhadap *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 pada beberapa makanan laut baik yang mentah atau yang telah diolah.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2009, Keajaiban Pada Cumi-cumi dan gurita, diakses pada tanggal 2 Juni 2009, <http://ingatlahaku.blogspot.com/2009/02/keajaiban-pada-cumi-cumi-dan-gurita.html>.
- Ackman, D., Marks, S., Mack, P., Caldwell, M., Root, T. and Birkhead, G. 1997. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: Evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol Infect.* 119:1-8.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S. and Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 31:2483-2488.
- Bouvet, J., Bavai, C., Rossel, R., Le Roux, A., Montet, M. P., Ray Gueniot. S., Mazuy, C., Arquilliere, C. and Vernozy Rozand, C. 2001. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157: H7 in pig carcasses from three French slaughter houses. *Int J Food Microbiol.* 71:249-255.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acid Research.* 7:1513-1523.
- Coyne, Vernon E., M.D. James, S. J. Reid, 2001, PCR Primer design and reaction Optimisation, Departement of molecular and cell biology, University of Cape Town.
- Christine M. Thorp. 2008. Pharmacology for the Health Care Professions, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. University of Salford.
- Chai, L. C., Fatimah, A. B., Ghazali, F. M., Lee, H.Y., Tunung, R., Shamsinar, A.T., Laila, R. A. S., Thahirah, A. Z., Malakar, P. M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2008. Biosafety of *Campylobacter jejuni* from raw vegetables consumed as *Ulam* with reference to their resistance to antibiotics. *International Food Research Journal* 15: 125-134.
- Desmarchelier PM. 2003. Pathogenic vibrios. In: Foodborne microorganisms of public health significance Sixth Edition. Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch) Food Microbiology Group: New South Wales, Australia: 333-358.
- Doyle, M. P., and V.V. Padhye. 1989. Foodborne Bacterial Pathogens. Wisconsin-Madison, New York.

- Desselberger, U. 1998. Resistance to antibiotics and other antimicrobial agents. *SGM Quarterly* 25:94-95.
- DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C. A., Tenge, B. J., Nordstrom, J. L., Wells, J., Puhr, N., Gendel, S. M.. 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3999-4005.
- Dileep, V., H.S. Kumar, Y. Kumar, M. Nishibuchi, I. Karunasagar and I. Karunasagar, 2003. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36: 423-427.
- Darmono. 1991. *Budidaya Udang Penaeus*. Kanisius. Yogyakarta.
- Davies J. 1981. Suppression of resistance, The future of antibiotherapy and antibiotic research. Academic Press.Sydney. 297-308.
- Dirita, V.J. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by *toxR* in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. 6:451-458.
- Fernandez, T. F., 2008, *E.coli* O157:H7, *Rev. Veterinary World*, 3: 83-87.
- Franklin TJ. 1977, Bacterial resistance to antibiotics. *Pharmaceutical Microbiology*. Melbourne: Blackwell Scient Publ.: 137-154.
- French, G.L., Woo, M.L., Hui, Y.W., Chan, K.Y. 1989. Antimicrobial susceptibilities of halophilic vibrios, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 24: 183-194.
- Gelfand, D.H., and White, T.J. 1990. Thermostable DNA polymerase, A guide to methode and application. Academic Press. San Diego.
- Garcia M.E.C, C.V. Salinas, and E.I.Q. Rami´rez, 2004. Serologic and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater and Fish Products of the Gulf of Mexico, *J.Appl.Enviromen Microbiol.* 70:6401-6406.
- Gourmelon, M., M.P. Montet, S. Lozach, C. Le Mennec, M. Pommepuy, L. Beutin and C. Vernozy-Rozand. 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *J. of Appl. Microbiol.* 100(1) : 85-97.
- Goodman & gilman's, 2006, the pharmacological basis of therapeutics - 11th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved. Printed in the United States of America.

- Griffin, P.M. and R.V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Eschericia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13:60-98.
- Ganiswara, S. G, R. Setiabudy, F. D. Suyatna, Purwantiastuti, 1995, *Farmakologi dan Terapi*, edisi 4, Fakultas Kedokteran U. I., U. I. Press, Jakarta.
- Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., J. Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, N., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M. and Kumagai, S. 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct haemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ Microbiol.* 69:3883-3891.
- Hernandes, L.C. Glenda, E. Cifuentes, S.J. Rothenberg. 2003. Environmental factors associated with the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in sea product and risk of food poisoning in communities bordering the gulf of Mexico. *J. Environ Health Research*, 5:75-80.
- Hayaschi, Sachiko, M. Okura, R. Osawa. 2006. Soft Agar Coated Filter Method for Early detection of Viable and Thermostable Direct Hemolysin (TDH) or TDH Related Hemolysin Producing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, *Appl. Environ Microbiol.* 4576-4582.
- Hancock, D., Besser, T., Le Jeune, J., Davis, M. and Rice, D. 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* 66:71-78.
- Holt, J.G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Maryland : William & Wilkins.
- Hart, E., L. Matsuda, C. Hernandez, M. L. Rioseco, J. Romero, N. G. Escalona, J. M. Urtaza, and R. T. Espejo. 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks, Southern Chile. *Emerg Infect Dis.* 1502:1-13.
- Höller, C., Koschinsky, S. and Witthuhn, D. 1999. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from municipal sewage. *Lancet* 353:2039.
- Irmawati, S. 2006. Keanekaragaman Jenis Kepiting Bakau *Scylla sp*, Lembaga Penelitian UNHAS. Sulawesi.
- Iida T., KS Park, O. Suthienkul., J.Kozawa, T.Yamaichi, K.Yamamoto, T.Honda. 1998. Close Proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Microbiol.* 144:2517-23.

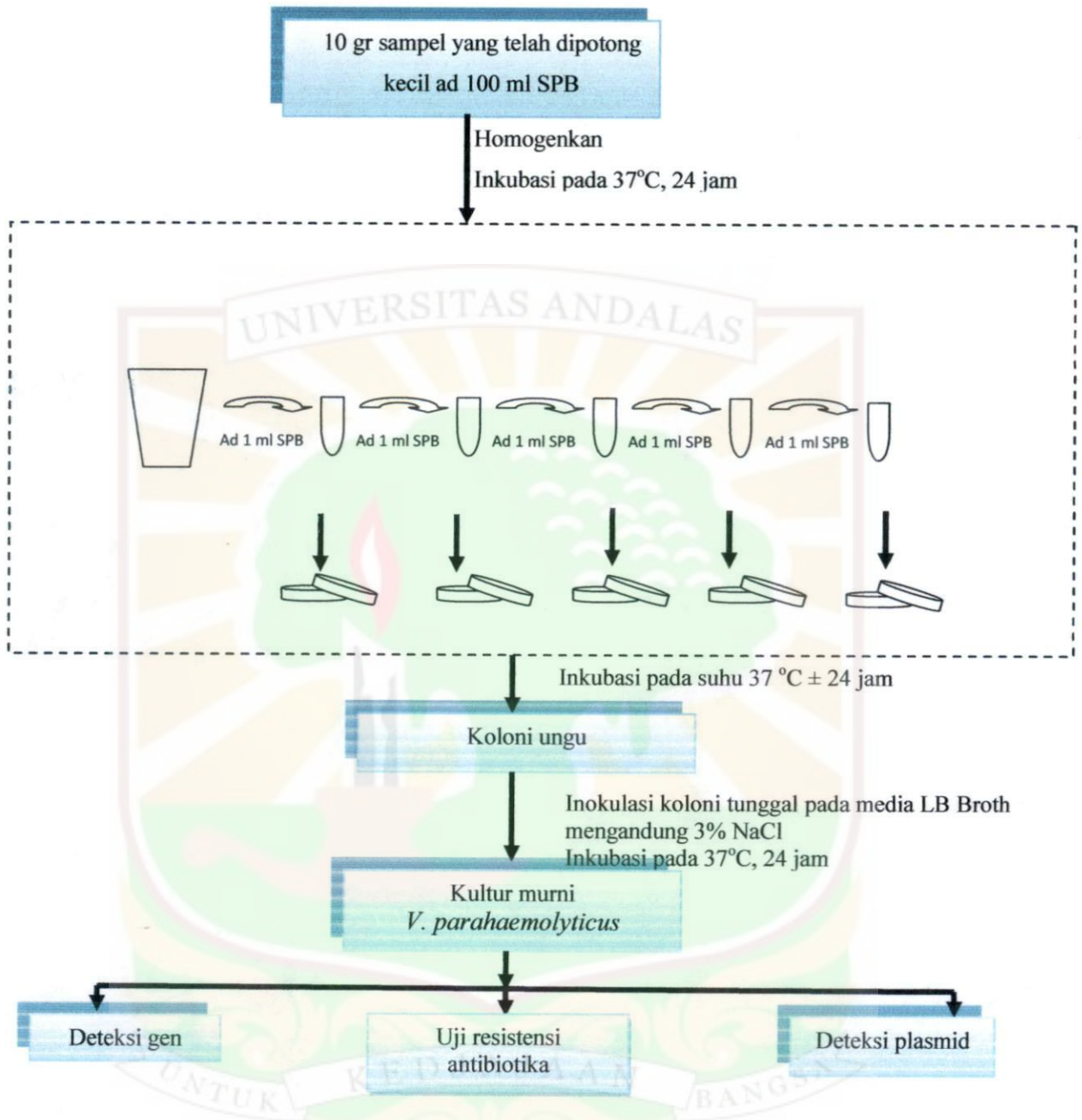
- Jothikumar, N. and M. W. Griffiths, 2002, Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays, *Appl. Environ. Microbiol.* 6:3169-3171.
- Jamsari. 2007. Bioteknologi Pemula, Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler. UNRI Press. Pekanbaru.
- Kaysner, C. I., and A. Depaola. 2001. *Vibrio*. Microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Target to the *toxR* Gene. *J. Clin. Microbiol.* 37:1173-1177.
- Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior. 1985. The Association between Hemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151:775-782.
- Koitaishi, T., V. Vuddhakul, S. Radu, T. Morigaki, N. Asai, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi. 2005. Genetic Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Strains Carrying the *stx2* Gene but Not Producing Shiga Toxin 2. *J. Immunol. Microbiol.* 50:135-148.
- Karlowsky, J.A., Jones, M.A., Draghi, D.C. and Sahm, D.F. 2003. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with different susceptibilities to ceftriaxone and cefotaxime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3155-3160.
- Li, J., Yie, J., Foo, W.T., Ling, Julia, M.L., Huaishu, X. and Norman, Y.S 1998. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. *Marine Pollution Bulletin* 39:45-49.
- Linda, N.W. and Asim, K.B. 2006. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish by Use of Multiplexed Real-Time PCR with *TaqMan* Fluorescent Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2031-2042.
- Lynch, T., Livingstone, S., Beunavventura, E., Lutter, E., Fedwick, J., Buret, A.G., Graham, D., & Vinney, R.D. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* Disruption Cell Tight Junctions Occurs Independently of Toxin Production. *Infection and Immunity*. 73:1275-1283
- McCarter L. 1999. The Multiple Identities of *Vibrio parahaemolyticus*, *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1:51-57.
- Marlina, 2008. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolitycus* dengan metode biolog dan deteksi gen *toxR* nya secara PCR. *J. Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol. 13, No. 1.

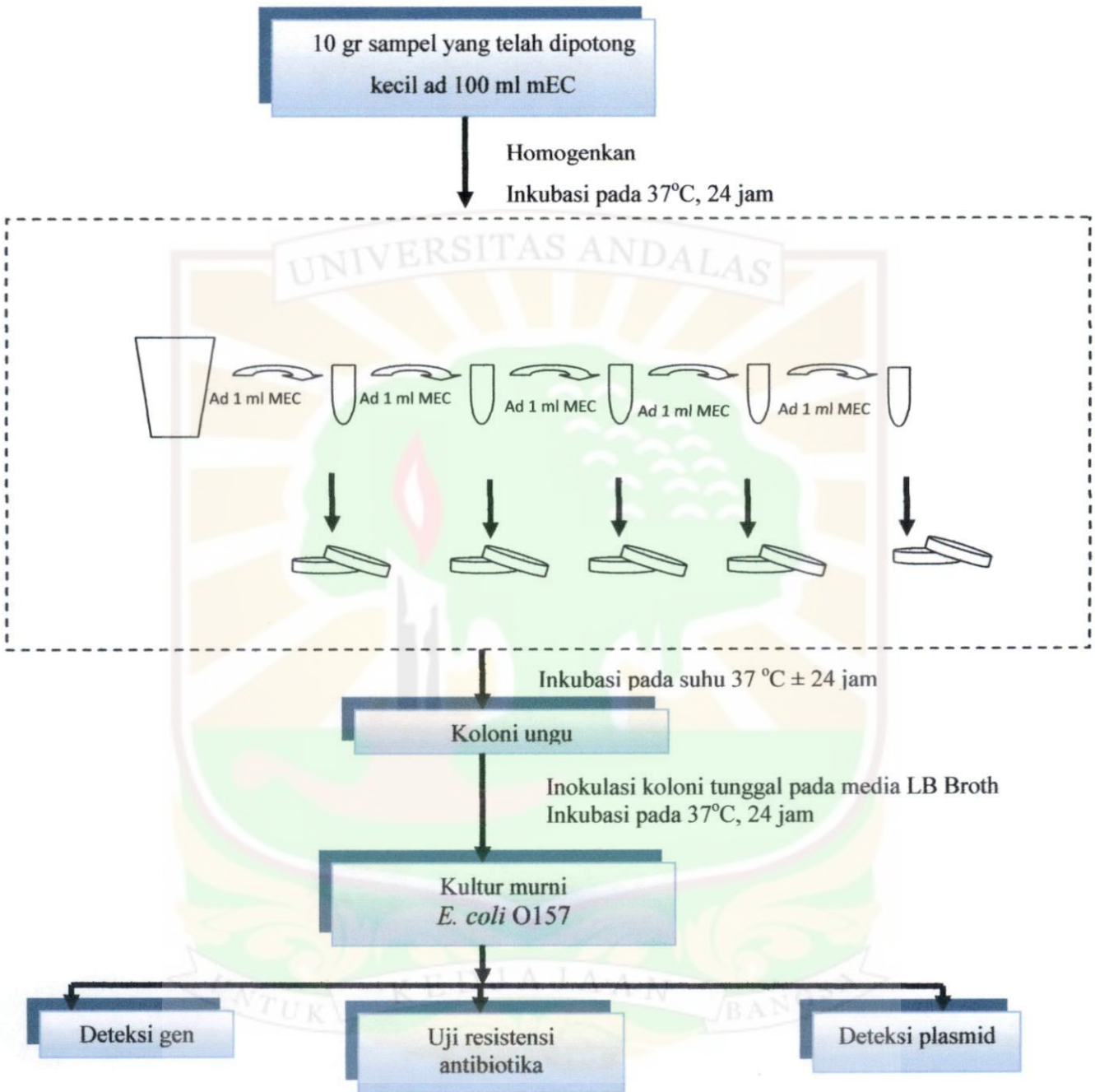
- Marlina, Son Radu, Cheah Yoke Kqueen, Suhaimi Napis, Zunita Zakaria, Sahilah Abd Mutalib, and Mitsuaki Nishibuchi. 2007. Detection of *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Corbicula molitkiana* prime in West Sumatera Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 38:349-355.
- Mead, P. S. and Griffin, P. M. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352, 1207-1212.
- Meng, Jianghong, S. Zhao, M.P. Doyle, S.E. Mitchell, S. Kresovich. 1996. Polymerase Chain Reaction for Detecting *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Microbiol.* 32:103-133.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Ramamurthy, T., Wong, H., DePaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J., M. Nishibuchi, M., 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains of evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585.
- Mullis, K.B., and Fallona F.A.. 1989. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Academic Press, San Diego.
- Mutshler, E. 1991. *Dinamika Obat*, Edisi ke 5, Alih bahasa oleh Mathilda. B. W, dan Anna. S. R, ITB, Bandung.
- Miller, V.L., Taylor, R.K. and Mekalanos, J.J. 1987. Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48: 271-279.
- Meyer, L.W. 1988. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Review* 1: 228-243.
- Nishibuchi, M. 2004. In *International handbook of foodborne pathogens*. In Milliots and Bier, J.W. (Eds). *Vibrio parahaemolyticus*, p. 237-252. United States: Marcel Dekker, Inc.
- Nishibuchi, M. & Kaper, J.B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* : a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Imunity*. 63 : 2093-2099.
- Nakasone, Noboru, H. H. Tran, M.B. Nguyen, N. Higa, C. Toma, T. Song, Y. Ichinose, M. Iwanaga. 2005. Isolation Of *Escherichia coli* O157:H7 From Fecal Samples Of Cows In Vietnam, *J. Trop. Med. Hyg.*, 73(3): 586–587.
- Neu, C.H. 1992. The crisis in antibiotic resistance. 257:1064-1072.
- Nataro, J.P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrhegenic *Escherichia coli*, *Rev. Clin. Microbiol*, 11, No. 1, p. 142-201.

- Nikaido, H., Prevention of drugs acces to bacterial targets: permeability barrier and active efflux, *Science*, 264:382-388.
- Old, R.W., dan S. B. Primrose. 1989. Prinsip-prinsip Manipulasi Gen, Ed.IV, Erlangga, Jakarta.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M., dan Nishibuchi, M. 1997. Analysis of Thermostable Direct Hemolysin (*tdh*) Genes and the *tdh*-Related Hemolysin (*trh*) Genes in Urease-Postitive Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated on The West Coast of The United States. *J. Clin Microbiol.* 35 : 1965-1971.
- Ottaviani, D., Bacchiocchi, I. Masini, L., Francesca, L., Carraturo, A., Giammarioli, M. and Sbaraglia, G. 2001. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic *vibrios* isolated from seafood. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18: 135-140.
- O'Brien, A.D., M. R. Thompson, J. R. Cantey, and S. B. Formal. 1997. Production of a Shigella dysenteriae-like Toxin by Pathogenic *Eschericia coli*, Abstr. B-103. In Abstracts of the 77th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1997. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Olsen, S. J., Miller, T. Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W. and Mead, P. 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Infect Dis* 8: 370-375.
- Paton, J. C., and A. W. Paton. 1998. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:450-479.
- Russell DG, Parnell WR, Wilson NC *et al* . 1999. NZ Food: NZ People. Key results of the 1997 national Nutrition Survey. Wellington: Ministry of Health.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnsons, N. T. Hargertt, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Eschericia coli* Serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
- Rangka, N. A, 2005. Status Usaha Kepiting Bakau Ditinjau Dari Aspek Peluang Dan Prospeknya, Balai Riset Perikanan Bududaya Air Payau, Maros.
- Rosenthal,A., 1992. PCR amplification techniques for chromosome walking. *TIBTECH* 10:44-48

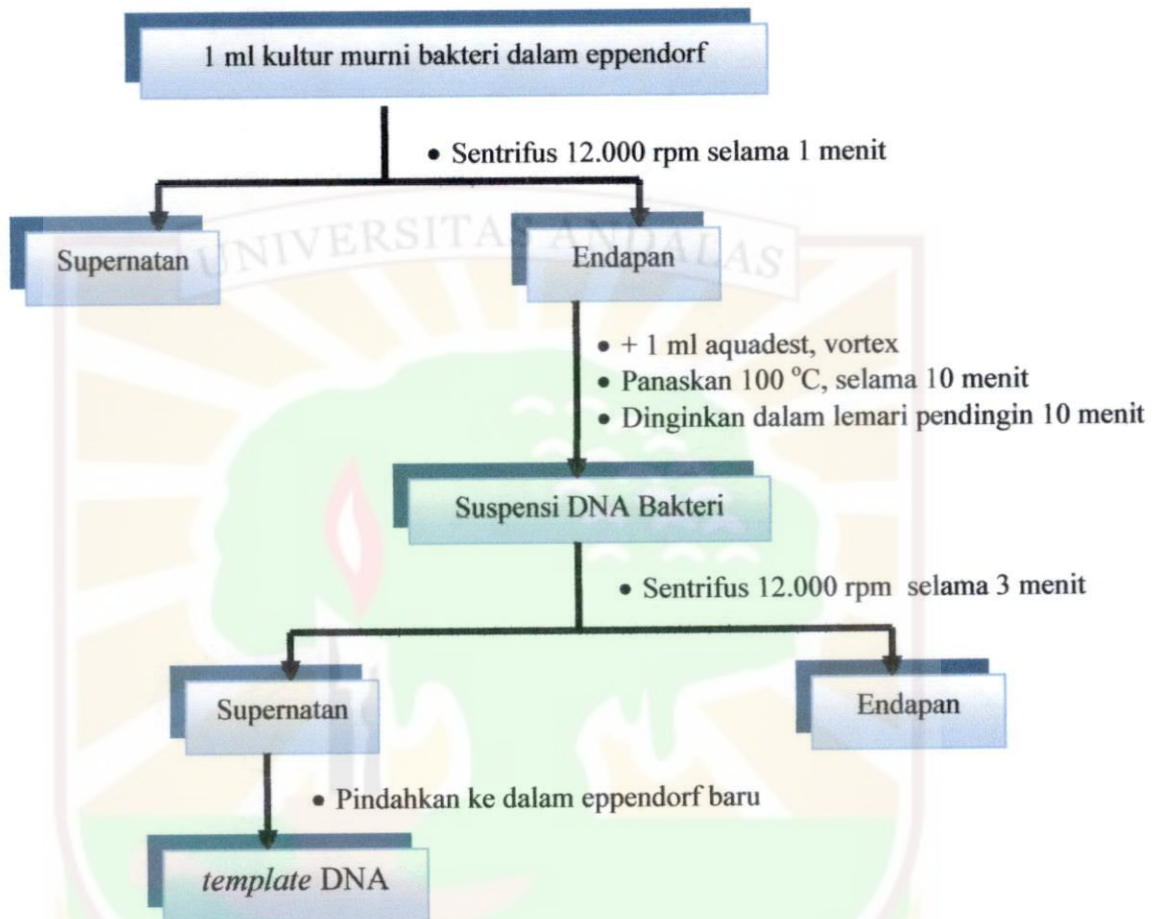
- Richmond MH, Petrocheilou V. 1981. The ecology of transferable antibiotic resistance.: The Future of Antibiotherapy & Antibiotic Research. Academic Press.Sydney:59-71.
- Ronald, G.L. and Santos, G. 2001. Guide to foodborne pathogens. In Ronald, G.L.and G. Santos, G. (Eds), p. 228 – 234.New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Robin, T., Bilung, L. M., Cheah, Y. K., Salleh, N. A., Chai, L. C., Ragavan, U. M., Lee, H. Y, Gunsalam, J. W., Haryani, Y., Patrick, G. B., Adli, M. R., Yousr, A. N., Murugaiah, C., Ghazali, F. M., Bakar, F. A., Malakar, P.K. and Son Radu. 2007. Isolation and characterization of *Salmonella* species from street foods and clinical samples. Journal of Food Safety 27: 345-361.
- Rojlarsakul, P., Vichai B., Watanalai P., Orasa S., Tirasak P. 1998. Detection of *Vibrio parahameolyticus* in shrimp haemolymph by DNA hybridization and PCR amplification, Inflegel TW(ed) Advances in shrimp biotechnology national center for genetic engineering and biotechnology, Bangkok.
- Sujeewa, A. K. W., Norrakiah, A. S. & Laina, M. 2009. Prevalence of Toxic Genes *Vibrio parahameolyticus* in Shrimps (*Penaeus monodon*) and Culture Environment. J. Intern Food Research . 16 : 89-95.
- Sudrajat, D., M. Lina, dan F. Suhadi. 2000. Deteksi cepat bakteri escherichia coli enterohemoragik (EHEK) dengan metode PCR (polymerase chain reaction), Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, Batan Jakarta.
- Salle, A. J. 1961. Fundamemtal Principles of Bacteriology, 5th ed, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York.
- Sambrook, E.F. Fritisch, T. Maniatis, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Spratt, B.G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations, science. 264:388-393.
- Sechi, L.A., Dupre, I., Deriu, A., Fadda, G. and Zanetti, S. 2000. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. Journal of Applied Microbiology 88: 475-481.
- Shirei, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., & Nishibuchi, M. 1990. Molecular Epidemiologic Evidence for Association of Thermostable Direct Hemolysin (TDH) and TDH-Related Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with Gastroenteritis. Infection and Immunity. 58 : 3568-3573

- Vernozy-Rozand, C., Montet, M., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray- Gueniot, S., Bouvet, J., Mazuy-Cruchaudet, C. and Richard, Y. 2002. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. J Appl Microbiol 93:473-478.
- Wattimena, J. R., 1991, Farmakodinamik dan Terapi Antibiotika, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Wurtzel, E. T. 2002. Plasmid DNA, Molecular Biology, 27, 420-442.
- Wegrzyn, G. 2004. Plasmid, Journal of Microbiology, 53, 14-22, 2000.
- Wong, Chung-Hin, S.H.Liu, L.W.Ku, I.Y.Lee, T.K.Wang, Y.S. Lee, C.L. lee, L.P. Kuo, and D.Y.C. Shih. 1999. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from food Poisoning Outbreaks during 1999-1995 in Taiwan. Dept of Microbiology, Soochong University, Taiwan.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Penerbit Andi Yogyakarta.
- Zschock, M., Hamann, H. P., Kloppert, B. and Wolter, W. 2000. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett Appl Microbiol 31:203-208.

Lampiran 1. Skema kerja**Gambar 1. Skema isolasi *V. parahaemolyticus***

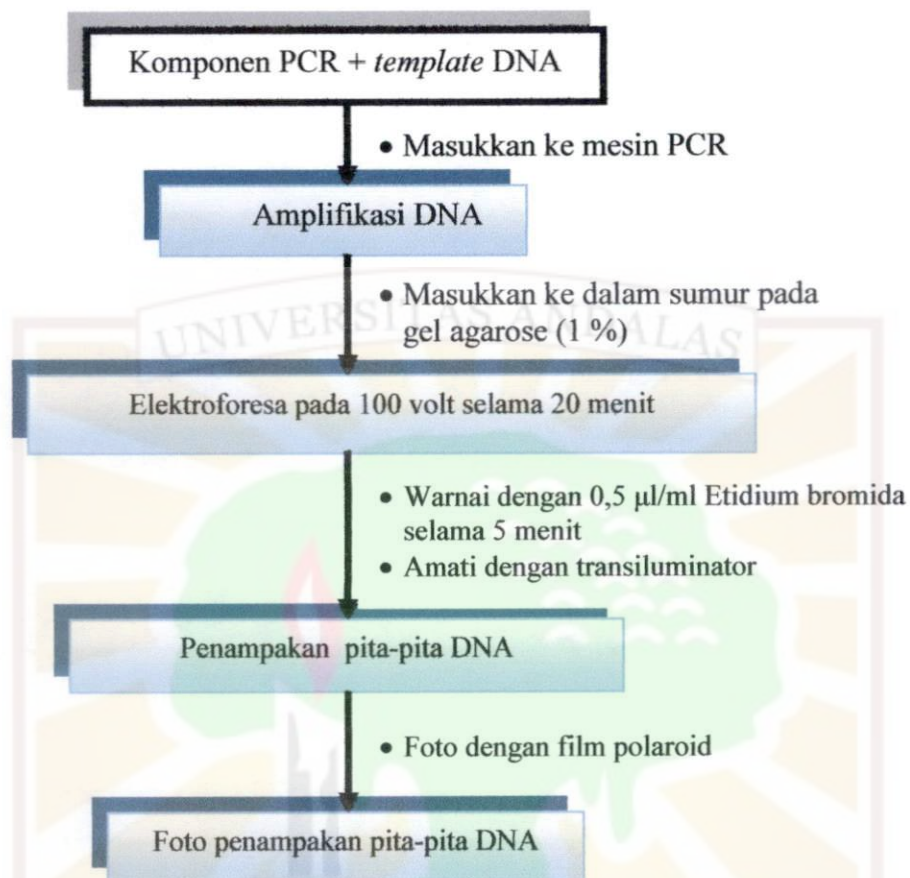
Lampiran 1. (lanjutan)**Gambar 2. Skema isolasi *E. coli* O157**

Lampiran 1. (lanjutan)



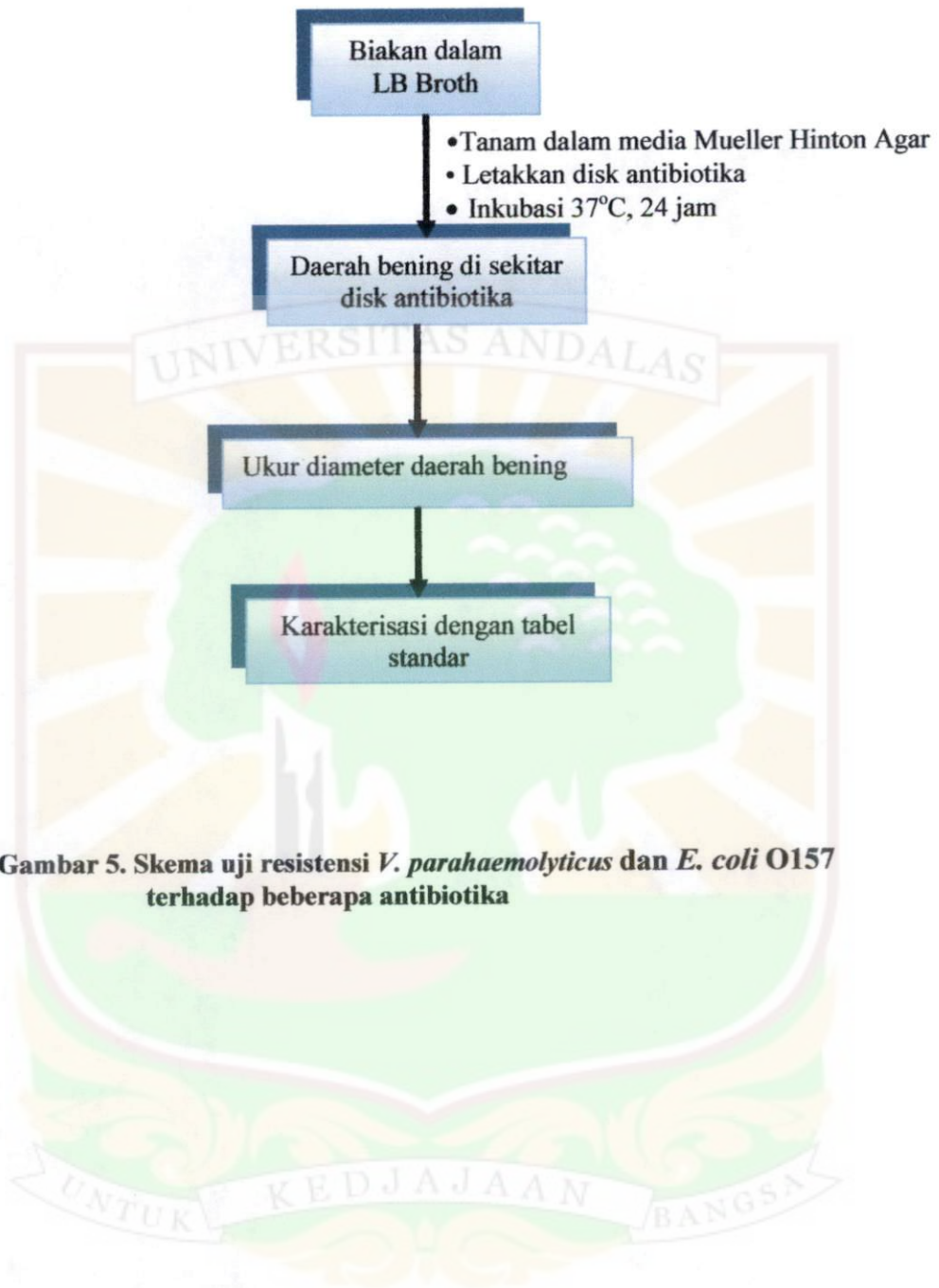
Gambar 3. Skema pembuatan *template* DNA bakteri dengan metode *Boil Cell Extraction*

Lampiran 1. (lanjutan)



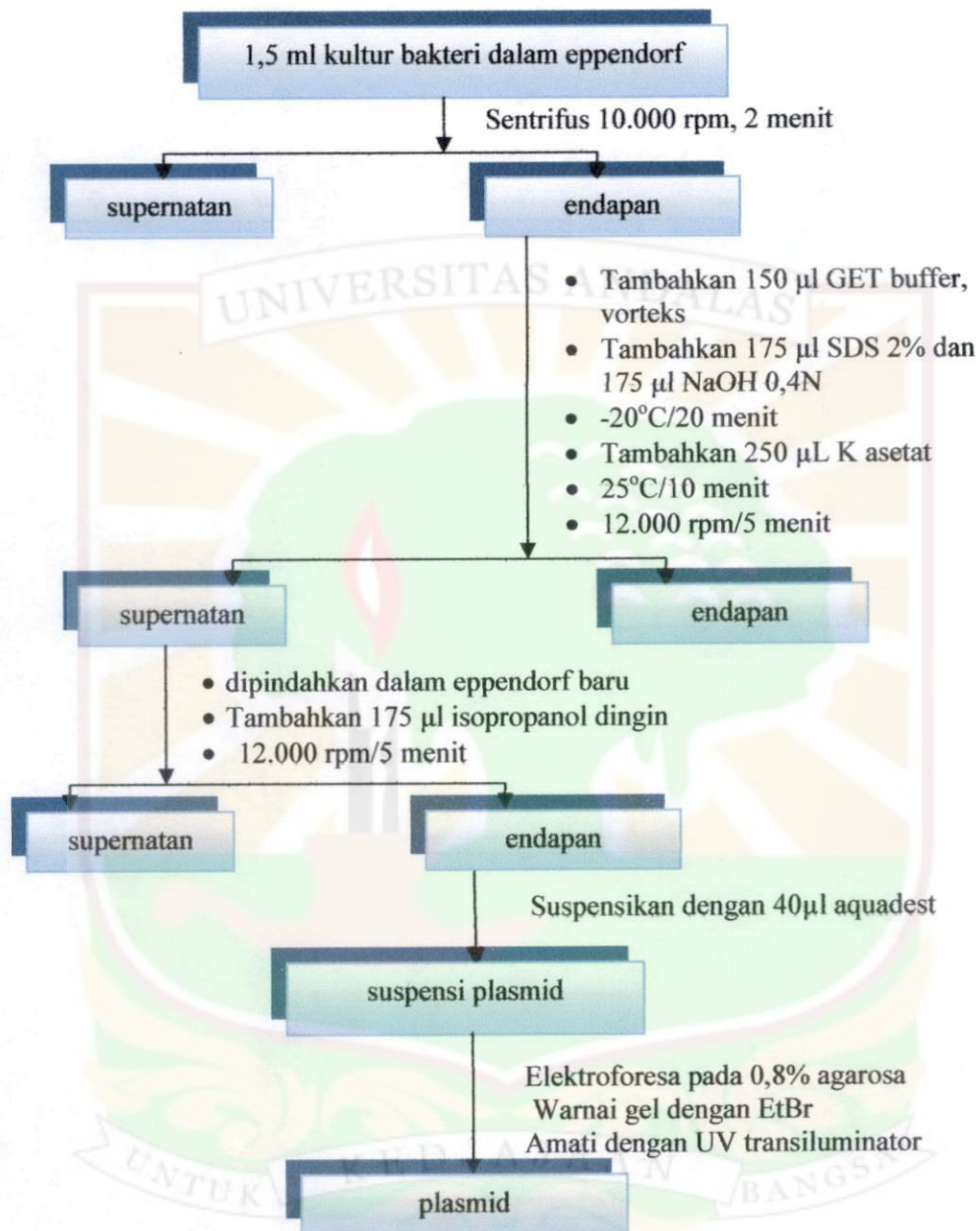
Gambar 4. Skema pendeteksian gen *V. parahaemolyticus* (*toxR*, *tdh*, dan *trh*) dan gen *E.coli* O157 (*stx1*, *stx2*)

Lampiran 1. (lanjutan)



Gambar 5. Skema uji resistensi *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157 terhadap beberapa antibiotika

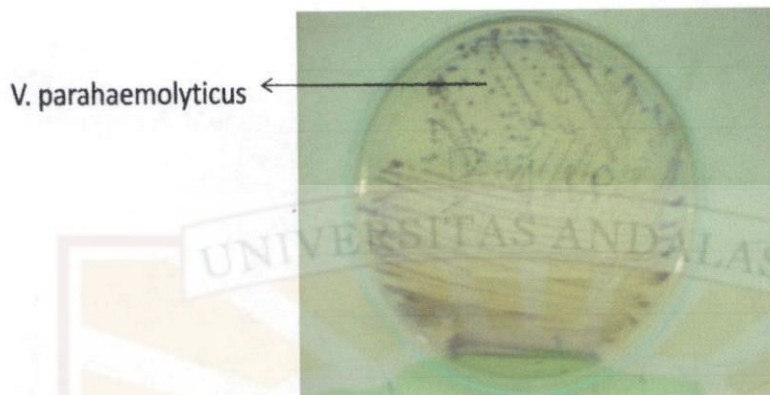
Lampiran 1. (lanjutan)



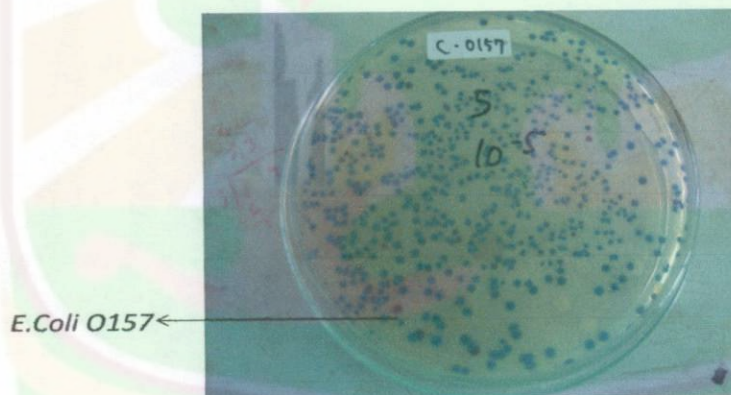
Gambar 6. Skema kerja deteksi plasmid

Lampiran 2. Foto sampel**a. Udang Kelong (*Penaues indicus*)****b. Udang Putih (*Penaues merguensis*)****c. Cumi-cumi (*Loligo vulgaris*)****d. Kepiting (*Scylla serrata*)****Gambar 7. Foto sampel makanan laut**

Lampiran 3. Foto hasil isolasi bakteri *V. parahaemolyticus* dan *E. coli* O157



Gambar 8. Koloni ungu *V. parahaemolyticus*



Gambar 9. Koloni ungu *E. coli* O157

**Lampiran 4. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid isolat
*V. parahaemolyticus***

**Tabel VIII. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid isolat
*V. parahaemolyticus***

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen			Pola resistensi	Plasmid
		<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
1	UKA1	+	+	-	AmSulTet	tidak terdeteksi
2	UKA2	+	+	-	AmEriGenSul	tidak terdeteksi
3	UKA3	+	+	-	AmEriSul	terdeteksi
4	UKA4	+	-	-	AmKloSul	tidak terdeteksi
5	UKA5	+	-	-	AmKloGenSulTet	tidak terdeteksi
6	UKA6	+	+	-	GenSul	tidak terdeteksi
7	UKB1	+	+	-	AmGenSulTet	tidak terdeteksi
8	UKB2	+	-	-	AmKloEriGenSulTet	tidak terdeteksi
9	UKB3	+	+	-	SulTet	terdeteksi
10	UKB4	+	+	-	Am	tidak terdeteksi
11	UKB5	+	+	-	AmKloGenSul	terdeteksi
12	UKB6	+	-	-	Eri	tidak terdeteksi
13	UKB7	+	-	-	AmEriSul	terdeteksi
14	UKB8	+	-	-	AmKloGenSul	tidak terdeteksi
15	UKC1	+	-	-	AmEriSul	tidak terdeteksi
16	UKC2	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
17	UKC3	+	-	-	AmSul	terdeteksi
18	UKC4	+	-	-	KloSulTet	tidak terdeteksi
19	UKC5	+	-	-	AmGenSul	terdeteksi
20	UKC6	+	-	-	EriSul	tidak terdeteksi
21	UKC7	+	-	-	AmKloEriGenSul	tidak terdeteksi

Lampiran 4. (Lanjutan)

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen			Pola resistensi	Plasmid
		<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
22	UKC8	+	-	-	AmGenSulTet	tidak terdeteksi
23	UPA1	+	-	-	AmEriGenSulTet	tidak terdeteksi
24	UPA2	+	-	-	AmKloEriSulTet	tidak terdeteksi
25	UPA3	+	-	+	EriSul	terdeteksi
26	UPA4	+	-	+	AmGenSul	tidak terdeteksi
27	UPA5	+	-	-	AmKloSul	terdeteksi
28	UPA6	+	-	+	AmEriSul	tidak terdeteksi
29	UPA7	+	-	+	AmSul	terdeteksi
30	UPB1	+	-	+	Am	tidak terdeteksi
31	UPB2	+	-	-	AmGenSul	tidak terdeteksi
32	UPB3	+	-	-	AmkloEriGenSulTet	tidak terdeteksi
33	UPB4	+	-	-	AmSulTet	tidak terdeteksi
34	UPB5	+	-	-	AmSul	terdeteksi
35	UPB6	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
36	UPB7	+	-	-	EriGenSul	tidak terdeteksi
37	UPB8	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
38	UPB9	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
39	UPB10	+	-	-	KloSul	tidak terdeteksi
40	UPC1	+	-	-	AmEriSul	tidak terdeteksi
41	UPC2	+	-	-	AmSulTet	terdeteksi
42	UPC3	+	-	-	AmGenSulTet	tidak terdeteksi
43	UPC4	+	-	-	AmKloEriSulTet	tidak terdeteksi
44	UPC5	+	-	-	AmKloTet	tidak terdeteksi
45	CCA1	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi

Lampiran 4. (Lanjutan)

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen			Pola resistensi	Plasmid
		<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
46	CCA2	+	-	-	EriGenSul	tidak terdeteksi
47	CCA3	+	-	-	KloEriSul	tidak terdeteksi
48	CCA4	+	-	-	AmEriSul	terdeteksi
49	CCA5	+	-	-	AmKloTet	tidak terdeteksi
50	CCB1	+	-	-	AmSulTet	tidak terdeteksi
51	CCB2	+	-	-	AmEriSul	tidak terdeteksi
52	CCB3	+	-	+	KloGenSulTet	tidak terdeteksi
53	CCB4	+	-	-	AmEriSul	tidak terdeteksi
54	CCB5	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
55	CCB6	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
56	CCC1	+	-	-	AmSul	terdeteksi
57	CCC2	+	-	-	kloEriGen	tidak terdeteksi
58	CCC3	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
59	CCC4	+	-	-	EriGenSulTet	tidak terdeteksi
60	CCC5	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
61	CCD1	+	-	-	AmEriSul	terdeteksi
62	CCD2	+	-	-	AmSul	terdeteksi
63	CCD3	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
64	CCD4	+	-	-	AmEriSulTet	tidak terdeteksi
65	KPA1	+	-	-	AmEriGen	tidak terdeteksi
66	KPA2	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
67	KPA3	+	-	-	AmEriGenTet	terdeteksi
68	KPA4	+	-	-	KloEriSul	terdeteksi

Lampiran 4. (Lanjutan)

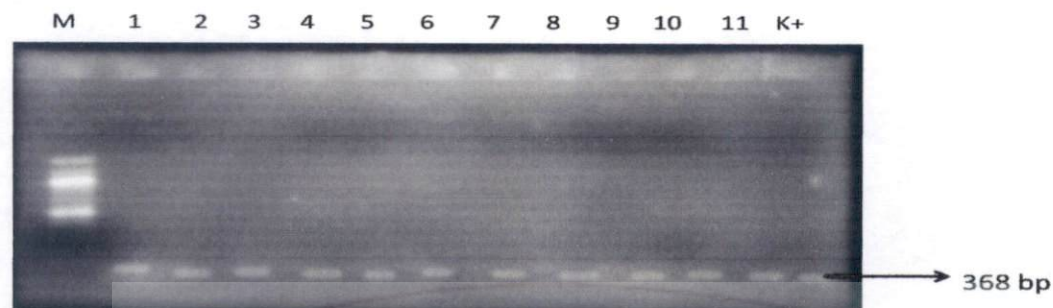
No. isolat	kode sampel	Deteksi gen			Pola resistensi	Plasmid
		<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
69	KPA5	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
70	KPA6	+	-	-	AmEriSul	tidak terdeteksi
71	KPA7	+	-	-	AmSulTet	tidak terdeteksi
72	KPB1	+	-	-	KloEriGenSulTet	tidak terdeteksi
73	KPB2	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
74	KPB3	+	-	-	AmEriSul	tidak terdeteksi
75	KPB4	+	-	-	AmEri	tidak terdeteksi
76	KPB5	+	-	-	Sul	tidak terdeteksi
77	KPB6	+	-	-	AmGenSul	tidak terdeteksi
78	KPB7	+	-	-	AmEriSulTet	tidak terdeteksi
79	KPC1	+	-	-	AmGenSul	terdeteksi
80	KPC2	+	-	-	KloEriSulTet	tidak terdeteksi
81	KPC3	+	-	-	KloEriSulTet	tidak terdeteksi
82	KPC4	+	-	-	AmEriSul	terdeteksi
83	KPC5	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
84	KPC6	+	-	-	AmEriGenSulTet	tidak terdeteksi
85	KPC7	+	-	-	AmSul	tidak terdeteksi
86	KPC8	+	-	-	AmSulTet	tidak terdeteksi

Lampiran 4. (Lanjutan)**keterangan :**

- UK (A,B,C) = Udang Kelong (positif bakteri VP pada pengambilan I, II,III)
UP (A,B,C) = Udang Putih (positif bakteri VP pada pengambilan I, II,III)
CC (A,B,C,D)= Cumi-cumi (positif bakteri VP pada pengambilan I, II,III, IV)
KP (A,B,C) = Kepiting (positif bakteri VP pada pengambilan I, II,III)
+ = Positif terdeteksi
- = Negatif terdeteksi
Am = Ampisilin
Eri = Eritromisin
Gen = Gentamisin
Sul = Sulfametoksazol
Tet = Tetrasiklin



Lampiran 4. (Lanjutan)



Gambar 10. Foto gel agarose 1% gen *toxR* hasil elektroforesa

Keterangan :

M : Marker 100 bp DNA ladder, standar ukuran pita DNA

K+ : Kontrol positif positif *V. parahaemolyticus* (368 bp) strain No. AQ 4037

1 - 11: Nomor isolat yang positif mengandung gen *toxR*



Gambar 11. Foto gel agarose 1% gen *tdh* hasil elektroforesa

Keterangan :

M : Marker 100 bp DNA ladder, standar ukuran pita DNA

K+ : Kontrol positif *V. parahaemolyticus* (250 bp) Strain No. AQ 3815

1,2,3,6,7,9,10,11 : Nomor isolat yang positif mengandung gen *tdh*



Gambar 12. Foto gel agarose 1% Gen *trh* hasil elektroforesa

Keterangan :

M : Marker 100 bp DNA ladder, standar ukuran pita DNA

K+ : Kontrol positif *V. parahaemolyticus* (251 bp) Strain No. AQ 3815

3, 6, 7,8 : Nomor isolate yang positif mengandung gen *trh*

Lampiran 4. (Lanjutan)

Tabel IX. Rekapitulasi hasil deteksi gen *toxR*, *tdh*, *trh* isolat *V. parahaemolyticus*

Gen virulen yang dimiliki	Jumlah	Persentase (%)	Nomor isolat
Gen <i>tdh</i>	8	9,30	1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11
Gen <i>trh</i>	5	5,81	25, 28, 29, 30, 52
Gen <i>toxR</i>	86	74,78	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86

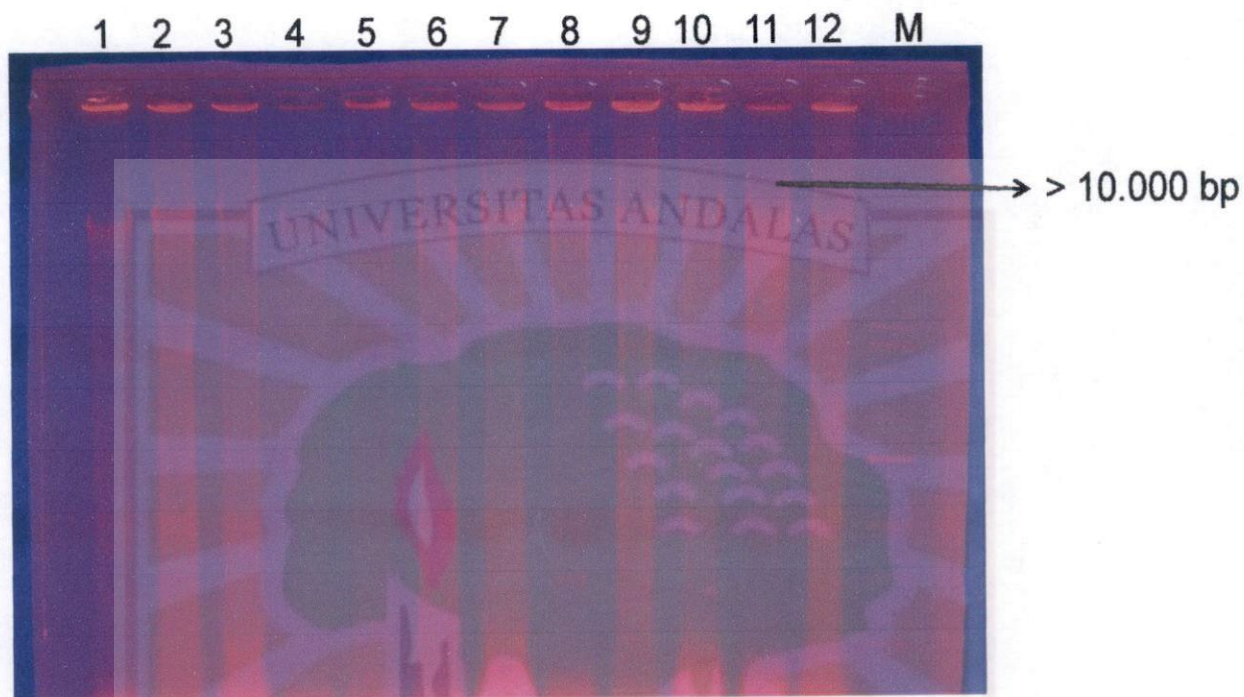
Tabel X. Hasil uji resistensi dan sensitivitas isolat *V. parahaemolyticus* terhadap beberapa antibiotika

Antibiotika	Jumlah isolat			
	Sensitif		Resisten	
	Jumlah	%	Jumlah	%
Ampisilin	19	22,09	67	77,90
Kloramfenikol	65	75,58	21	24,44
Eritromisin	48	55,81	38	44,18
Gentamisin	59	68,60	27	31,39
Sulfametoksazol	6	6,98	80	93,02
Tetrasiklin	61	70,93	25	29,06

Tabel XI. Rekapitulasi isolat *V. parahaemolyticus* yang resisten pada beberapa jenis antibiotika

Resisten terhadap	Jumlah isolat	Persentase
1 Jenis Antibiotika	3	3,49
2 Jenis Antibiotika	28	32,56
3 Jenis Antibiotika	33	38,37
4 Jenis Antibiotika	12	13,95
5 Jenis Antibiotika	8	9,30
6 Jenis Antibiotika	2	2,33

Lampiran 4. (Lanjutan)



Gambar 13. Foto hasil elektroforesa gel plasmid *V. parahaemolyticus*

Keterangan :

M = Marker plasmid 10.000 bp

1,2,3,4,6,7,8,9,10, 11 = strain *V. parahaemolyticus* yang mempunyai plasmid >10.000 bp

Lampiran 4. (Lanjutan)

Tabel XII. Data Hasil uji resistensi *Vibrio parahaemolyticus* pada sampel makanan laut terhadap beberapa antibiotika

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
1		9		R		23		S		26		S		16		S		10		R		14		R
2		9		R		19		S		15		R		11		R		13		R		26		S
3		11		R		22		S		21		R		21		S		8		R		21		S
4		15		R		13		R		23		S		19		S		12		R		24		S
5		10		R		15		R		25		S		13		R		9		R		16		R
6		20		S		25		S		27		S		13		R		11		R		23		S
7		16		R		19		S		27		S		13		R		9		R		18		R
8		16		R		14		R		19		R		11		R		10		R		17		R
9		19		S		21		S		23		S		17		S		13		R		12		R
10		9		R		23		S		24		S		21		S		16		S		21		S
11		8		R		12		R		23		S		14		R		14		R		21		S
12		23		S		24		S		15		R		21		S		16		S		26		S
13		15		R		19		S		19		R		17		S		11		R		24		S
14		13		R		16		R		26		S		12		R		11		R		20		S
15		11		R		22		S		14		R		18		S		13		R		20		S
16		14		R		20		S		24		S		18		S		15		R		20		S
17		10		R		25		S		23		S		21		S		12		R		25		S
18		21		S		12		R		24		S		16		S		10		R		13		R
19		9		R		21		S		24		S		13		R		10		R		21		S
20		21		S		19		S		13		R		19		S		9		R		23		S
21		15		R		15		R		21		R		14		R		14		R		20		S
22		15		R		24		S		26		S		11		R		12		R		12		R

Lampiran 4. (Lanjutan)

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
23		12		R		21		S		17		R		14		R		10		R		18		R
24		9		R		17		R		19		R		22		S		12		R		15		R
25		19		S		23		S		15		R		19		S		9		R		24		S
26		16		R		19		S		25		S		13		R		11		R		24		S
27		12		R		13		R		23		S		17		S		10		R		21		S
28		12		R		25		S		21		R		17		S		10		R		25		S
29		12		R		25		S		26		S		17		S		11		R		27		S
30		18		R		21		S		25		S		21		S		14		S		23		S
31		13		R		24		S		25		S		13		R		9		R		21		S
32		9		R		12		R		20		R		14		R		12		R		14		R
33		12		R		24		S		25		S		20		S		9		R		21		S
34		11		R		20		S		23		S		18		S		12		R		24		S
35		10		R		20		S		24		S		17		S		15		R		23		S
36		17		S		20		S		21		R		14		R		11		R		22		S
37		12		R		25		S		26		S		17		S		12		R		20		S
38		16		R		24		S		23		S		20		S		14		R		21		S
39		21		S		17		R		24		S		19		S		10		R		24		S
40		15		R		24		S		18		R		19		S		11		R		25		S
41		10		R		23		S		24		S		17		S		14		R		17		R
42		12		R		23		S		25		S		14		R		9		R		18		R
43		12		R		11		R		19		R		16		S		9		R		18		R
44		11		R		13		R		25		S		16		S		17		S		15		R

Lampiran 4. (Lanjutan)

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
45		13		R		25		S		23		S		19		S		13		R		20		S
46		20		S		21		S		20		R		11		R		12		R		20		S
47		18		S		15		R		22		R		18		S		10		R		20		S
48		9		R		24		S		18		R		17		S		13		R		24		S
49		11		R		11		R		25		S		21		S		13		R		23		S
50		11		R		22		S		24		S		21		S		12		R		18		R
51		10		R		22		S		19		R		21		S		11		R		21		S
52		21		S		17		R		26		S		10		R		11		R		14		R
53		11		R		21		S		22		R		20		S		11		R		23		S
54		14		R		24		S		25		S		17		S		9		R		20		S
55		9		R		19		S		23		S		18		S		10		R		21		S
56		16		R		19		S		23		S		16		S		14		R		21		S
57		22		S		14		R		18		R		14		R		12		R		19		R
58		14		R		25		S		24		S		18		S		12		R		23		S
59		25		S		21		S		17		R		10		R		13		R		24		S
60		12		R		20		S		24		S		17		S		9		R		23		S
61		16		R		24		S		16		R		19		S		9		R		23		S
62		9		R		23		S		26		S		21		S		9		R		26		S
63		10		R		23		S		25		S		18		S		11		R		20		S
64		12		R		23		S		21		R		21		S		14		R		16		R
65		14		R		21		S		20		R		13		R		16		S		21		S
66		11		R		25		S		24		S		21		S		11		R		25		S

Lampiran 4. (Lanjutan)

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
67		11		R		19		S		18		R		18		R		17		S		14		R
68		17		S		12		R		20		R		18		S		10		R		23		S
69		11		R		24		S		26		S		17		S		15		R		25		S
70		13		R		21		S		19		R		19		S		9		R		21		S
71		13		R		23		S		24		S		21		S		9		R		13		R
72		17		S		12		R		21		R		13		R		9		R		14		R
73		15		R		25		S		23		S		20		S		14		R		25		S
74		10		R		23		S		12		R		21		S		12		R		21		S
75		12		R		23		S		17		R		21		S		17		S		21		S
76		18		S		20		S		13		R		16		S		14		R		24		S
67		11		R		19		S		18		R		18		R		17		S		14		R
68		17		S		12		R		20		R		18		S		10		R		23		S
69		11		R		24		S		26		S		17		S		15		R		25		S
70		13		R		21		S		19		R		19		S		9		R		21		S
71		13		R		23		S		24		S		21		S		9		R		13		R
72		17		S		12		R		21		R		13		R		9		R		14		R
73		15		R		25		S		23		S		20		S		14		R		25		S
74		10		R		23		S		12		R		21		S		12		R		21		S
75		12		R		23		S		17		R		21		S		17		S		21		S
76		18		S		20		S		13		R		16		S		14		R		24		S
74		10		R		23		S		12		R		21		S		12		R		21		S
75		12		R		23		S		17		R		21		S		17		S		21		S

Lampiran 4. (Lanjutan)

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
76		18		S		20		S		13		R		16		S		14		R		24		S
77		14		R		24		S		25		S		11		R		12		R		21		S
78		15		R		21		S		20		R		16		S		12		R		13		R
79		15		R		24		S		24		S		13		R		12		R		24		S
80		18		S		15		R		18		R		19		S		12		R		14		R
81		17		S		17		R		21		R		11		R		9		R		23		S
82		16		R		24		S		13		R		21		S		10		R		21		S
83		13		R		22		S		25		S		21		S		13		R		21		S
84		9		R		21		S		21		R		14		R		9		R		15		R
85		10		R		21		S		24		S		20		S		13		R		24		S
86		13		R		25		S		25		S		17		S		12		R		18		R

Lampiran 5. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid pada isolat *E.coli* O157

Tabel XIII. Hasil deteksi gen, pola resistensi dan deteksi plasmid pada isolat *E.coli* O157

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen		Pola resistensi	Plasmid
		stx1	stx2		
1	UKA1	-	+	AmKloEriGenSulTet	tidak terdeteksi
2	UKA2	-	-	TD	TD
3	UKA3	-	-	TD	TD
4	UKA4	-	-	TD	TD
5	UKA5	+	+	AmGenTet	tidak terdeteksi
6	UKA6	+	-	AmGen	tidak terdeteksi
7	UKB1	+	+	KloEriGenSul	tidak terdeteksi
8	UKB2	+	+	AmSulTet	terdeteksi
9	UKB3	+	+	KloGenSul	tidak terdeteksi
10	UKB4	+	-	AmGenSul	tidak terdeteksi
11	UKB5	-	-	TD	TD
12	UKB6	-	+	AmKloEri	terdeteksi
13	UKC1	-	+	AmGenSul	terdeteksi
14	UKC2	-	-	TD	TD
15	UKC3	-	+	AmKloGenSul	terdeteksi
16	UKC4	-	-	TD	TD
17	UKC5	-	+	KloSulTet	terdeteksi
18	UKC6	-	-	TD	TD
19	UKC7	-	-	TD	TD
20	UKC8	-	-	TD	TD
21	UPA1	-	+	AmKloGenSulTet	tidak terdeteksi

Lampiran 5. (Lanjutan)

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen		Pola resistensi	Plasmid
		stx1	stx2		
22	UPA2	-	-	TD	TD
23	UPA3	+	-	AmKloEriGenSul	tidak terdeteksi
24	UPA4	+	-	AmGen	tidak terdeteksi
25	UPA5	+	+	Am	tidak terdeteksi
26	UPA6	-	-	TD	TD
27	UPA7	-	+	AmKloEriSulTet	tidak terdeteksi
28	UPB1	-	+	AmKloSul	terdeteksi
29	UPB2	-	+	AmEriGenSul	tidak terdeteksi
30	UPB3	-	-	TD	TD
31	UPB4	-	-	TD	TD
32	UPB5	-	-	TD	TD
33	UPB6	-	-	TD	TD
34	UPB7	-	-	TD	TD
35	UPB8	-	-	TD	TD
36	UPB9	-	-	TD	TD
37	UPB10	-	-	TD	TD
38	UPC1	-	-	TD	TD
39	UPC2	-	-	TD	TD
40	UPC3	-	-	TD	TD
41	CCA1	-	+	AmKloGenSulTet	tidak terdeteksi
42	CCA2	-	-	TD	TD
43	CCA3	-	-	TD	TD

Lampiran 5. (Lanjutan)

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen		Pola resistensi	Plasmid
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		
44	CCA4	-	+	AmSul	terdeteksi
45	CCA5	-	+	AmGen	tidak terdeteksi
46	CCB1	-	+	AmKloSul	tidak terdeteksi
47	CCB2	-	+	KloGenSul	tidak terdeteksi
48	CCB3	-	-	TD	TD
49	CCB4	-	+	AmKlo	tidak terdeteksi
50	CCB5	-	+	AmKloEriGenSul	tidak terdeteksi
51	CCB6	-	-	TD	TD
52	CCC1	+	-	AmKloGenSulTet	tidak terdeteksi
53	CCC2	+	-	Tet	tidak terdeteksi
54	CCC3	-	-	TD	TD
55	CCC4	+	-	AmGenSul	terdeteksi
56	CCC5	-	-	TD	TD
57	CCD1	+	-	AmKloGenSulTet	terdeteksi
58	CCD2	+	-	GenSul	tidak terdeteksi
59	CCD3	+	-	kloGenSul	tidak terdeteksi
60	CCD4	-	-	TD	TD
61	KPA1	+	-	AmKlo	tidak terdeteksi
62	KPA2	+	-	AmKloEriGenSul	terdeteksi
63	KPA3	-	-	TD	TD
64	KPA4	+	-	Eri	tidak terdeteksi
65	KPA5	-	-	TD	TD

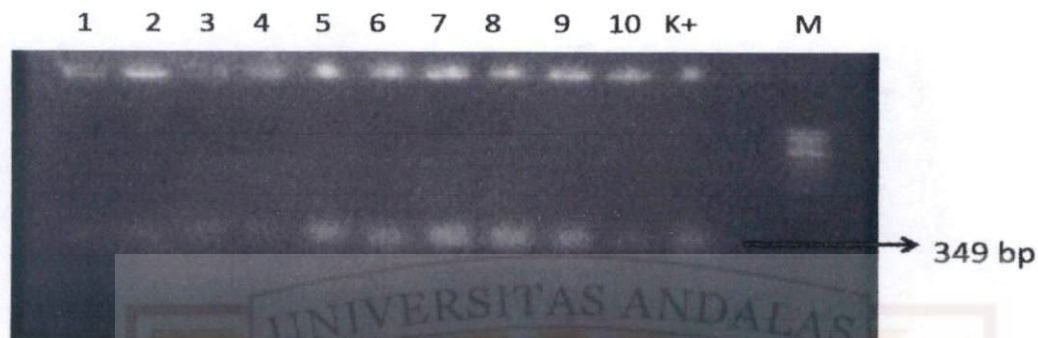
Lampiran 5. (Lanjutan)

No. isolat	kode sampel	Deteksi gen		Pola resistensi	Plasmid
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		
66	KPA6	+	-	AmKloSul	tidak terdeteksi
67	KPA7	-	-	TD	TD
68	KPB1	-	-	TD	TD
69	KPB2	-	-	TD	TD
70	KPB3	-	-	TD	TD
71	KPB4	-	-	TD	TD
72	KPB5	-	-	TD	TD
73	KPB6	-	-	TD	TD
74	KPB7	-	+	AmSulTet	tidak terdeteksi
75	KPC1	-	-	TD	TD
76	KPC2	-	-	TD	TD
77	KPC3	-	-	AmGen	tidak terdeteksi
78	KPC4	-	-	GenSulTet	terdeteksi
79	KPC5	-	-	AmEriSulTet	tidak terdeteksi
80	KPC6	-	-	AmKloGenSul	terdeteksi
81	KPC7	-	-	TD	TD

Keterangan :

- UK (A,B,C) = Udang Kelong (positif bakteri EC O157 pada pengambilan I, II,III)
 UP (A,B,C) = Udang Putih (positif bakteri EC O157 pada pengambilan I, II,III)
 CC (A,B,C,D) = Cumi-cumi (positif bakteri EC O157 pada pengambilan I, II,III, IV)
 KP (A,B,C) = Kepiting (positif bakteri EC O157 pada pengambilan I, II,III)
 TD = Tidak dilakukan uji resistensi antibiotik
 + = Positif terdeteksi
 - = Negatif terdeteksi
 Am = Ampisilin
 Eri = Eritromisin
 Gen = Gentamisin
 Sul = Sulfametoksazol
 Tet = Tetrasiklin

Lampiran 5. (Lanjutan)



Gambar 14. Foto gel agarose 1% gen *stx1* hasil elektroforesa

Keterangan :

- M : Marker 100 bp DNA ladder, standar ukuran pita DNA
 K+ : Kontrol positif *E. coli* O157 (349 bp) Strain No. DL 933
 5 sampai 10 : Nomor isolat yang positif mengandung gen *stx1*



Gambar 15. Foto gel agarose 1% gen *stx2* hasil elektroforesa

Keterangan :

- M : Marker 100 bp DNA ladder, standar ukuran pita DNA
 K : kontrol positif *E. coli* O157 (404 bp), strain no. T12 (3337)
 1, 5, 7, 8, 9 : Nomor isolat yang positif mengandung gen *stx2*

Lampiran 5. (Lanjutan)

Tabel XIV. Rekapitulasi hasil deteksi gen *stx1* dan *stx2* pada isolat *E.coli* O157

Gen virulen yang dimiliki	Jumlah	Persentase (%)	Nomor isolat
Gen <i>stx1</i>	19	23,45	5, 6, 7, 8, 9, 10, 23, 24, 25, 52, 53, 55, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66
Gen <i>stx2</i>	26	32,09	1, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 17, 21, 25, 27, 28, 29, 41, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 74, 77, 78, 79, 80
Gen <i>stx1</i> dan <i>stx2</i>	5	6,17	5, 7, 8, 9, 25
Tidak memiliki gen <i>stx1</i> dan <i>stx2</i>	41	50,61	2, 3, 4, 11, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 48, 51, 54, 56, 60, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 81

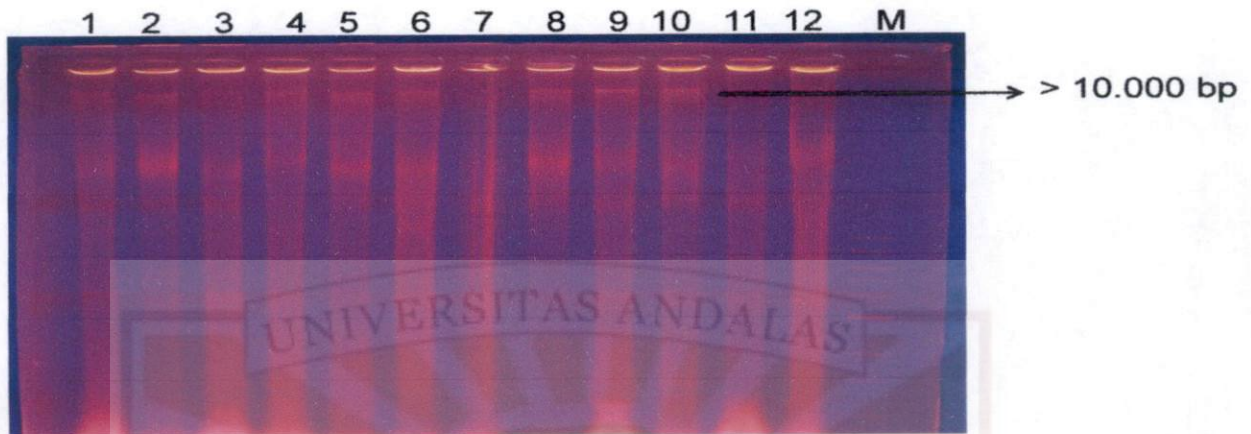
Tabel XV. Hasil uji resistensi dan sensitivitas isolat *E. coli* O157 terhadap beberapa antibiotika

Antibiotika	Jumlah isolat			
	Sensitif	%	Resisten	%
Ampisilin	9	22,5	31	77,5
Kloramfenikol	18	45	22	55
Eritromisin	30	75	10	25
Gentamisin	16	40	24	60
Sulfametoksazol	10	25	30	75
Tetrasiklin	25	62,5	15	37,5

Tabel XVI. Rekapitulasi isolat *E.coli* O157 yang resisten pada beberapa jenis antibiotika

Resisten terhadap	Jumlah isolat	Persentase
1 Jenis Antibiotika	3	7,5
2 Jenis Antibiotika	8	20
3 Jenis Antibiotika	15	37,5
4 Jenis Antibiotika	5	12,5
5 Jenis Antibiotika	6	15
6 Jenis Antibiotika	3	7,5

Lampiran 5. (Lanjutan)



Gambar 16. Foto hasil elektroforesa gel plasmid *E. coli* O157

Keterangan :

M = Marker plasmid 10.000 bp

1,2,3,4,6,7,8,9,10, 11 = isolat *E. coli* O157 yang mempunyai plasmid >10.000 bp

Lampiran 5. (Lanjutan)

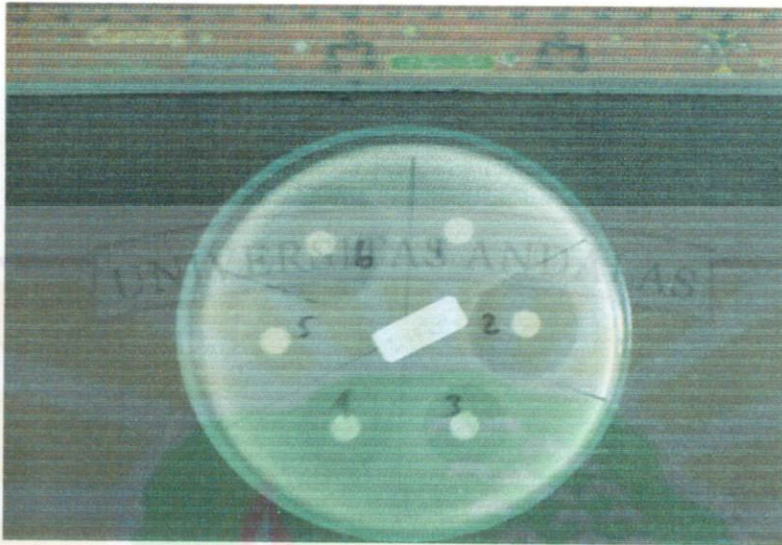
Tabel XVII. Data hasil uji resistensi *E. coli* O157 pada sampel makanan laut terhadap beberapa antibiotika

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
1		12		R		12		R		21		R		14		R		9		R		12		R
5		16		R		20		S		25		S		14		R		18		S		13		R
6		13		R		19		S		23		S		10		S		10		R		23		S
7		17		S		15		R		15		R		14		R		11		R		21		S
8		11		R		22		S		23		S		20		S		14		R		17		R
9		18		S		14		R		23		S		14		R		14		R		26		S
10		13		R		23		S		23		S		13		R		12		R		23		S
12		9		R		13		R		16		R		17		S		17		S		23		S
13		9		R		24		S		25		S		12		R		11		R		22		S
15		8		R		13		R		26		S		12		R		10		R		21		S
17		18		S		17		R		23		S		21		S		15		R		16		R
21		11		R		12		R		24		S		14		R		12		R		12		R
23		14		R		15		R		13		R		10		R		9		R		17		R
24		9		R		24		S		27		S		11		R		19		S		25		S
25		12		R		25		S		25		S		24		S		23		S		23		S
27		15		R		14		R		16		R		23		S		12		R		16		R
28		13		R		15		R		21		S		21		S		15		R		23		S
29		12		R		23		S		15		R		10		R		13		R		25		S
41		13		R		11		R		23		S		10		R		14		R		11		R
44		12		R		26		S		26		S		24		S		12		R		25		S
45		10		R		23		S		25		S		14		R		22		S		23		S
46		16		R		15		R		23		S		21		S		12		R		23		S

Lampiran 5. (Lanjutan)

Nomor isolat	Ampisilin (mm)			T	Kloramfenikol (mm)			T	Eritromisin (mm)			T	Gentamisin (mm)			T	Sulfametoksazol (mm)			T	Tetrasiklin (mm)			T
	R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S		R	I	S	
	≤13	14-16	≥17		≤12	13-17	≥18		≤13	14-22	≥23		≤12	13-14	≥15		≤10	11-15	≥16		≤14	15-19	≥20	
47		18		S		17		R		23		S		11		R		15		R		21		S
49		11		R		15		R		26		S		24		S		21		S		25		S
50		10		R		17		R		17		R		12		R		9		R		24		S
52		8		R		11		R		23		S		10		R		13		R		12		R
53		18		S		21		S		23		S		23		S		24		S		17		R
55		11		R		24		S		27		S		14		R		15		R		25		S
57		15		R		15		R		26		S		10		R		15		R		19		R
58		19		S		26		S		23		S		9		R		10		R		24		S
59		21		S		11		R		25		S		13		R		13		R		22		S
61		9		R		9		R		26		S		22		S		21		S		20		S
62		12		R		8		R		15		R		14		R		9		R		12		R
64		20		S		20		S		12		R		21		S		18		S		23		S
66		10		R		13		R		27		S		25		S		12		R		25		S
74		13		R		21		S		24		S		23		S		10		R		17		R
77		12		R		24		S		25		S		13		R		17		S		21		S
78		20		S		25		S		23		S		11		R		12		R		13		R
79		10		R		20		S		19		R		24		S		14		R		17		R
80		8		R		13		R		25		S		12		R		12		R		23		S

Lampiran 6. Contoh foto diameter daerah hambat pada uji resistensi terhadap beberapa antibiotika



Gambar 17. Contoh foto diameter daerah hambat pada uji resistensi terhadap beberapa antibiotika

Keterangan :

1. Ampisilin
2. Kloramfenikol
3. eritromisin
4. Gentamisin
5. Sulfametoksazol
6. Tetrasiklin

Lampiran 7. Komposisi media dan pereaksi

1. Media *Salt Polymixin Broth* (SPB)

Polymixin	33 g
Aquadest	1 L

2. Media CHROMagar Vibrio (CHROMagar™).

Media CHROMagar Vibrio memiliki komposisi :

Agar-agar	15,00 gram
Pepton	8,00 gram
Yeast ekstrak	8,00 gram
NaCl	51,40 gram
Chromogenic mix	0,30 gram

3. Media modified *E. coli* Broth

Media modified *E. coli* Broth terdiri dari:

Pepton	20,00 gram
Sodium chloride	5,00 gram
Bile Salts No. 3	1,12 gram
Laktosa	5,00 gram
Di-potassium hidrogen fosfat	4,00 gram
Potassium dihidrogen fosfat	1,5 gram
Aquadest steril	hingga 1 Liter

4. Media CHROMagar O157

Media CHROMagar O157 memiliki komposisi :

Agar	15,00 gram
Pepton	13,00 gram
Yeast ekstrak	13,00 gram
Chromogenic mix	1,20 gram
Aquadest	hingga 1 Liter

5. Media Luria Burtani (LB) broth.

Yeast ekstrak (Oxoid)	5,00 gram
NaCl (Merck)	30,00 gram
Trypton (Oxoid)	10,00 gram

6. Media Luria Burtani Agar (LBA).

Media Luria Burtani Agar memiliki komposisi :

Yeast ekstrak (Oxoid)	5,00 gram
NaCl (Merck)	51,40 gram
Trypton (Oxoid)	10,00 gram
Agar	10,00 gram
Aquadest	hingga 1 Liter

7. Media Mueller Hinton Agar (Merck®).

Media Mueller Hinton Agar memiliki komposisi :

Infusion from meat	2,00 gram
Casein hydrolisate	17,50 gram
Starch	1,50 gram
Agar-agar	13,00 gram.

8. Glucose-EDTA-Tris HCl (GET) buffer

50 mM Glucose	0.9 gram
25 mM Tris Hcl	0.39 gram
10 mM EDTA	0.37 gram
Aquadest	hingga 100 ml

9. Natrium Hidroksida (NaOH) 0.4N

NaOH	1.6 gram
Aquadest	Hingga 100 ml

10. Sodium Deodesyl Sulphate (SDS) 2%

SDS	2.0 gram
Aquadest	Hingga 100 ml

11. Kalium asetat 3 M

Kalium asetat	29.44 gram
Asam asetat glasial	11.5 gram
Aquadest	Hingga 100 ml

12. TBE (Tris Base-Boric Acid-EDTA) 10 x

Tris Base	121.1 gram
Boric Acid	55.0 gram
EDTA	7.4 gram
Aquadest	Hingga 1 L
TBE 1 x , 100 ml TBE ditambahkan Aquadest sampai 1 L	

